



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**RESPUESTA DE LAS CITOCINAS INFLAMATORIAS
SÉRICAS EN UN MODELO MURINO DE
ALZHEIMER**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

María de la Luz Pérez Uscanga



**DIRECTORA DE TESIS:
DOCTORA ERIKA PATRICIA RENDÓN
HUERTA
2016**

Ciudad Universitaria, CDMX



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El trabajo experimental del presente proyecto de tesis de licenciatura, fue realizado en el Laboratorio de Inmunobiología, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y fue parcialmente financiado por Proyecto PAPIIT IN-210813 y CONACYT- 177678.

“Nunca te olvides de sonreír porque el día que no sonrías será un día perdido”

Charles Chaplin

DEDICATORIA

A mi hermosa madre Claudia Uscanga y a mi padre Eduardo Pérez por darme la vida y ser un ejemplo de amor, sabiduría y paciencia. Gracias por enseñarme que nada es imposible y a nunca darme por vencida cuando se trata de alcanzar tus sueños, gracias por apoyarme siempre en cada cosa que necesité.

A mis hermanos Alejandro y René que con su cariño y motivación hicieron de cada noche de desvelo algo divertido. Gracias por sus consejos y por su amor inagotable, este logro es también de ustedes.

Los amo inmensamente por siempre jamás.

A mis tíos, Norma y Jorge por la ayuda y por el apoyo incondicional que siempre me brindaron en cada momento, por cuidar siempre de mí sin dejar de creer que podía lograrlo. A mis primos Uriel y Memo que más que primos son mis hermanos y estaré siempre que me necesiten.

A mis amigos de toda la vida Mike, Gerardo, Jorge, Toño y Betty porque ustedes son parte fundamental en mi vida y porque más que amigos somos la familia que cada uno escogió; por todos los momentos compartidos, las corretizas y las escondidas, las noches de azotea y las pláticas en las bancas; por el apoyo incondicional, las risas interminables y las lágrimas que terminaron en abrazos; por todas las enseñanzas y por existir.

A mis amigos Aldo, Fernando y Karina que se convirtieron en mis hermanos a lo largo de este camino por la Biología; por todas las cosas que descubrimos y las cosas que aprendimos juntos, por su apoyo incondicional y por la guía que me brindaron con cada uno de sus consejos durante toda la carrera, por su paciencia y por la complicidad y lealtad que nos guardamos, por las prácticas de campo que siempre terminaron en una aventura para contar, por las risas compartidas y los momentos de crisis en los que nunca nos abandonamos. Los quiero tanto amigos.

A cada persona que me apoyo en cada momento de este camino y que me sería imposible nombrarlas a todas pero saben que este logro también es gracias a ustedes; por las palabras de aliento y el cariño inmerecido que siempre he recibido.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Erika P. Rendón Huerta y al Dr. Luis Felipe Montaña por la dirección en la realización de este trabajo, por sus sabios consejos y por la enseñanzas y atención que me brindaron siempre, ya que me dieron las herramientas necesarias para ser un buen científico y por el cariño y la preocupación que siempre me han demostrado. Los quiero mucho.

Al M. en C. Luis Manuel Castillo por compartirme todo su conocimiento, por la guía, las enseñanzas y por demostrar su interés en la realización del trabajo. Por todo el tiempo y esfuerzo que dedico para ayudarme a concluirlo con éxito. Gracias además por demostrar la excelente persona que eres y por convertirte en un gran amigo y colega.

De manera especial al Dr. Sergio Vaca Pacheco por el apoyo, los consejos y las pláticas.

A la Dra. Gloria Luz Paniagua y a la Dra. María Rosa Ávila por su tiempo y por los conocimientos que me brindaron en la revisión y corrección de este trabajo.

A mis amigas Priscila, Anita y Ceci por tantas risas, por todas las comidas y todos los buenos momentos compartidos, por aceptarme y enseñarme tanto, es un verdadero placer tener su amistad y que compartan su conocimiento y su experiencia conmigo. Las adoro tanto, tanto.

A mis compañeros de Laboratorio Paco, Christian, Rous, Jahaziel, Hanen, Eli, Pris chiquita, Alhelí, Jazmín, Ashlin y Jane por compartir su conocimiento conmigo y por señalar mis debilidades y ayudarme a mejorar día con día.

A mis amigos del 52, Raúl, Héctor, Nuria, Karen, Karla, Quirino, Erick por todos esos buenos momentos que hemos compartido y que a pesar del tiempo y la distancia seguimos juntos de corazón. De manera especial a mi amigo Gustavo que se nos adelantó en el camino pero que desde donde esta sigue presente en cada uno de nosotros.

A cada uno de mis profesores por compartir su conocimiento y enseñarnos que el estudio de la vida es maravilloso e interminable.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de aprender y desarrollar mis habilidades de manera profesional en sus aulas y laboratorios en esta hermosa carrera que es la Biología; y por permitirme conocer a grandiosas personas y amigos que forjaron la persona que soy ahora.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	I
LISTA DE ABREVIATURAS	II
RESUMEN	1
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 La Enfermedad de Alzheimer	3
1.2 Amiloide- β (1-42) en la Enfermedad de Alzheimer	6
1.3 Amiloide- β (1-42) en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer ...	10
1.4 Amiloide β (1-42) y el Óxido Nítrico	12
1.5 Amiloide β (1-42) como activador de la respuesta inmunológica	13
1.6 Drenaje antigénico del Amiloide β (1-42)	14
1.7 Amiloide β (1-42) sérico	17
1.8 Acción del Amiloide β (1-42) en las células endoteliales	17
1.9 Amiloide β (1-42) y modelo animal	18
2 JUSTIFICACIÓN	20
3 OBJETIVO	21
3.1 Objetivo general	21
3.2 Objetivos particulares	21
4 MATERIAL Y MÉTODOS	22
4.1 Modelo animal	22
4.2 Preparación de A β (25-35)	22
4.3 Preparación de A β (25-35) "scrambled"	22
4.4 Cirugía Esterotáxica	23
4.5 Obtención de las muestras de hipocampo y sangre	24
4.6 Inmunohistoquímica	25
4.7 Proteínas totales de la fracción soluble de hipocampo	25
4.8 Nitritos séricos y de fracción soluble de hipocampo	26
4.9 Electroforesis	27
4.10 Transferencia	27
4.11 Western Blot para la detección del A β e interleucinas	27
4.12 Análisis estadístico	28

5	RESULTADOS	29
5.1	Depósitos de A β (25-35) en el hipocampo y en suero	29
5.2	Óxido Nítrico en el Hipocampo.....	31
5.3	Óxido Nítrico Sérico	32
5.4	Interleucinas.....	33
6	DISCUSIÓN.....	36
7	CONCLUSION	45
8	BIBLIOGRAFÍA.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. PROCESO NEUROPATOLÓGICO EN LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.	4
FIGURA 2 HISTOPATOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.....	5
FIGURA 3 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA VÍA NO-AMILOIDOGÉNICA.....	8
FIGURA 4 REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA VÍA AMILOIDOGÉNICA.....	9
FIGURA 5 MECANISMO GENERAL DE LA TOXICIDAD DE AB (1-42) EN LAS NEURONAS	11
FIGURA 6 RUTA PROPUESTA PARA EL DRENAJE ANTIGÉNICO POR LA VÍA DEL DRENAJE LINFÁTICO	14
FIGURA 7 DRENAJE LINFÁTICO	15
FIGURA 8 VÍAS DE ELIMINACIÓN DEL AB (1-42) EN EL CEREBRO	16
FIGURA 9 CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA	24
FIGURA 10 DETECCIÓN DEL AB (25-35) EN BIOPSIAS DE HIPOCAMPO DE RATAS	30
FIGURA 11 CONCENTRACIÓN DE NITRITOS	31
FIGURA 12 CONCENTRACIÓN DE NITRITOS SÉRICOS.....	32
FIGURA 13 CAMBIOS EN LOS NIVELES DE IFN- γ SÉRICO	33
FIGURA 14 CAMBIOS EN LOS NIVELES DE TNF-A E IL-6 SÉRICOS	34
FIGURA 15 CAMBIOS EN LOS NIVELES DE IL-17 SÉRICO.....	35
FIGURA 16 NIVELES DE IL-10 SÉRICO.....	35
FIGURA 17 POSIBLES VÍAS AFECTADAS EN LA SÍNTESIS DEL ÓXIDO NÍTRICO POR AMILOIDE-B.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS

AICD: Amino Intracelular Domain “Dominio Intracelular Amino-terminal”

ANOVA: Analysis of Variance “Análisis de Varianza”

APP: Amyloid Precursor Protein “Proteína Precursora del Amiloide”

A β : Amiloide- β

BACE-1: Beta- secretasa 1

CTF: C-terminal Fragment “Fragmento C-terminal”

DLC: Deterioro Cognitivo Leve

dpp: *dots per point* “puntos por punto”

EA: enfermedad de Alzheimer

EC: extracelular

eNOS: endotelial Nitric Oxide Synthase “Óxido Nítrico Sintetasa endotelial

ERO: Especies Reactivas de Oxígeno

ESA: Espacio Subaracnoideo

HRP: Peroxidasa de Rabano

IFN- γ : Interferon gamma

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-17: Interleucina 17

IL-1 β : Interleucina 1 β

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase “Óxido Nítrico Sintasa inducible

ISF: Solutos y Fluidos Intersticiales

kDa: kilo Daltons

LCE: Líquido Cerebroespinal

NFT: Neurofibrillary Tangles “Marañas Neurofibrilares”

NMDA: N-metil-D-aspartato

nNOS: neuronal Nitric Oxide Synthase “Óxido Nítrico Sintetasa neuronal”

NO: Nitric Oxide “Óxido Nítrico”

NOS: Nitric Oxide Synthase “Óxido Nítrico Sintasa”

PBS: Phosphate Buffered Saline

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis “Duodecil Sulfato de Sodio – Electroforesis de Gel de Poliacrilamida”

SNC: Sistema Nervioso Central

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

α -APPs: α -APP soluble



RESUMEN

El amiloide- β ($A\beta$) es un fragmento peptídico generado de un corte anormal de la Proteína Precursora del Amiloide (APP, por sus siglas en inglés); el cual puede ser de diferentes longitudes de residuos de aminoácidos: (1-40; 1-42; 25-35); de los cuales sólo el fragmento 1-40 es inocuo; los otros dos fragmentos comparten características inmunoreactivas y poseen actividad tóxica (necrosis, estrés celular, destrucción de uniones estrechas). La presencia de depósitos del $A\beta$ (1-42) en el hipocampo (denominados placas seniles), es una característica histopatológica del cerebro de pacientes con enfermedad de Alzheimer (EA); esto, en conjunto con el estrés oxidativo en el hipocampo, cambios en las concentraciones séricas de $A\beta$ (1-42) e interleucinas pro-inflamatorias. Sin embargo, actualmente el diagnóstico de la enfermedad de Alzheimer (EA) es presuntivo y confirmatorio post-mortem, debido a que se desconoce con certeza el inicio y desarrollo, tanto a nivel de cerebro como a nivel sistémico. Por ello, se han desarrollado modelos experimentales en animales para comprender la EA; uno de estos modelos en especial es la administración en el hipocampo de $A\beta$ (25-35) en ratas; el $A\beta$ (25-35) es un péptido sintético que se comporta de manera similar al $A\beta$ (1-42) ya que comparte las características inmunorreactivas y neurotóxicas. Sin embargo, ya que no se ha determinado si el $A\beta$ (1-42) es capaz de inducir estrés oxidativo y una respuesta inmunológica sistémica, el objetivo fue determinar si la administración en el hipocampo de $A\beta$ (25-35) en ratas Wistar podría inducir una respuesta inmunológica y oxidativa a nivel sistémico, que sea detectable en el suero. Para lo cual se midió el Óxido Nítrico, IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 y IL-17A en el suero en diferentes momentos después de la inyección, y se cuantificó el nivel de óxido nítrico en el hipocampo como control de daño en el mismo. Los resultados mostraron aumento del estado oxidativo desde las 1.5 hrs en el hipocampo y a partir de las 3 hrs en el suero; de este modo también se detectó respuesta pro-inflamatoria desde los 7 días posteriores a la inyección $A\beta$ (25-35)



caracterizada por aumento de la IFN- γ y así mismo aumento del TNF- α , y la IL-6 a partir del día 14. Respecto a la respuesta anti-inflamatoria, no se observó incremento en la producción de la IL-10 sin embargo se registró aumento significativo de la IL-17 posterior al día 14. En consecuencia, es posible decir que el incremento en la concentración de A β (25-35) en el hipocampo, es capaz de generar una respuesta sistémica caracterizada por estrés oxidativo, un perfil pro-inflamatorio y una respuesta anti-inflamatoria tardía o incompleta.



1 INTRODUCCIÓN

1.1 La Enfermedad de Alzheimer

La demencia es un síndrome –generalmente de naturaleza crónica o progresiva- caracterizado por el deterioro de la función cognitiva; aunque afecta principalmente a las personas mayores, no constituye una consecuencia normal del envejecimiento. La demencia afecta a la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el cálculo, la capacidad de aprendizaje, el lenguaje y el juicio. En el mundo entero hay unos 47,5 millones de personas que la padecen, y cada año se registran 7,7 millones de nuevos casos (Gutierrez-Robledo & Arrieta-Cruz, 2015). La demencia es causada por diversas enfermedades y lesiones que afectan al cerebro de forma primaria o secundaria, como accidentes cerebrovasculares ó la enfermedad de Alzheimer (EA).

La EA es la causa de demencia más común ya que representa entre un 60% y un 70% de los casos (Prince et al., 2013). Es un padecimiento crónico, neurodegenerativo y progresivo caracterizado por alteraciones en los procesos cognitivos, la conducta y el estado de ánimo. De acuerdo con el reporte mundial sobre la EA, en el año 2010, cerca de 35 millones de personas adultas mayores en el mundo la sufren. Se estima que para el año 2030 esta cifra se incremente a 66 millones para alcanzar una cifra de 115 millones de personas afectadas para el 2050. Esto significa que se presenta un nuevo caso de demencia cada 4 segundos (Viswanathan, Greenberg, & Scheltens, 2016). En la actualidad hay más de 13 millones de adultos mayores de 60 años en México que la padecen.

Clínicamente la EA es caracterizada por alteraciones cognitivas y conductuales (McKhann et al., 2011). En el desarrollo de la enfermedad se presentan dos etapas, el estado demencial denominado Alzheimer (Lazarczyk, Hof, Bouras, & Giannakopoulos, 2012) y un estadio previo denominado Deterioro Cognitivo Leve (DCL) el cual tiene características clínicas similares a la EA pero de menor



intensidad (Petersen et al., 2009). Sin embargo una característica que las diferencia significativamente durante el estadio del deterioro cognitivo leve (DCL) son los niveles significativamente altos de amiloide sérico; dichas alteraciones cognitivas y conductuales no llegan a provocar alteraciones en el desarrollo de las actividades diarias (Kelley & Petersen, 2007) (**Figura 1**).

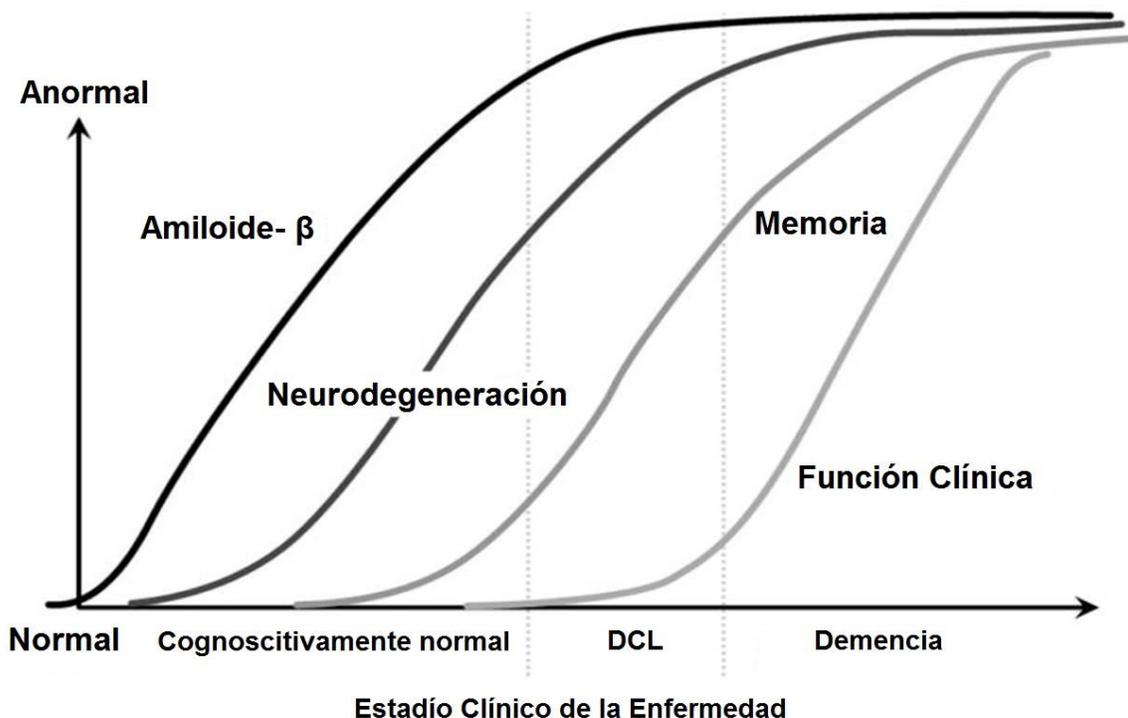


Figura 1. Proceso neuropatológico en la Enfermedad de Alzheimer.

Se esquematizan las principales alteraciones presentes en la EA y la posible relación que guardan con los estadios clínicos de la enfermedad como en la fase del Deterioro Cognitivo Leve (DCL) y la fase Demencia. Modificado de (Petersen et al., 2009).

Histológicamente la EA se caracteriza por la presencia de depósitos extracelulares de Amiloide- β (1-42) ($A\beta(1-42)$) tanto en el hipocampo, neuropilo cerebral y los vasos meningoencefálicos (Biere et al., 1996). Estos depósitos de $A\beta(1-42)$ oligomerizados se denominan placas seniles o placas amiloides, y en conjunto con las marañas neurofibrilares intracelulares (NFT por sus siglas en inglés, son formadas de proteínas Tau hiperfosforiladas), son las características neuropatológicas de la EA (Harrington, 2012).



La formación de las placas seniles y aumento de A β en el líquido cerebroespinal, se han descrito como eventos tempranos de la EA (Korolainen & Pirttila, 2009). Numerosos estudios genéticos, bioquímicos y neuropatológicos señalan al A β (1-42) y sus depósitos como la causa principal de la patogénesis en esta enfermedad (Selkoe, 1996). Actualmente no hay diagnóstico certero o tratamientos disponibles que detengan la progresión o reviertan la enfermedad, que se agrava a medida que avanza y, en la cual los factores asociados podrían conducir a la muerte (Drake, Link, & Butterfield, 2003). **(Figura 2)**

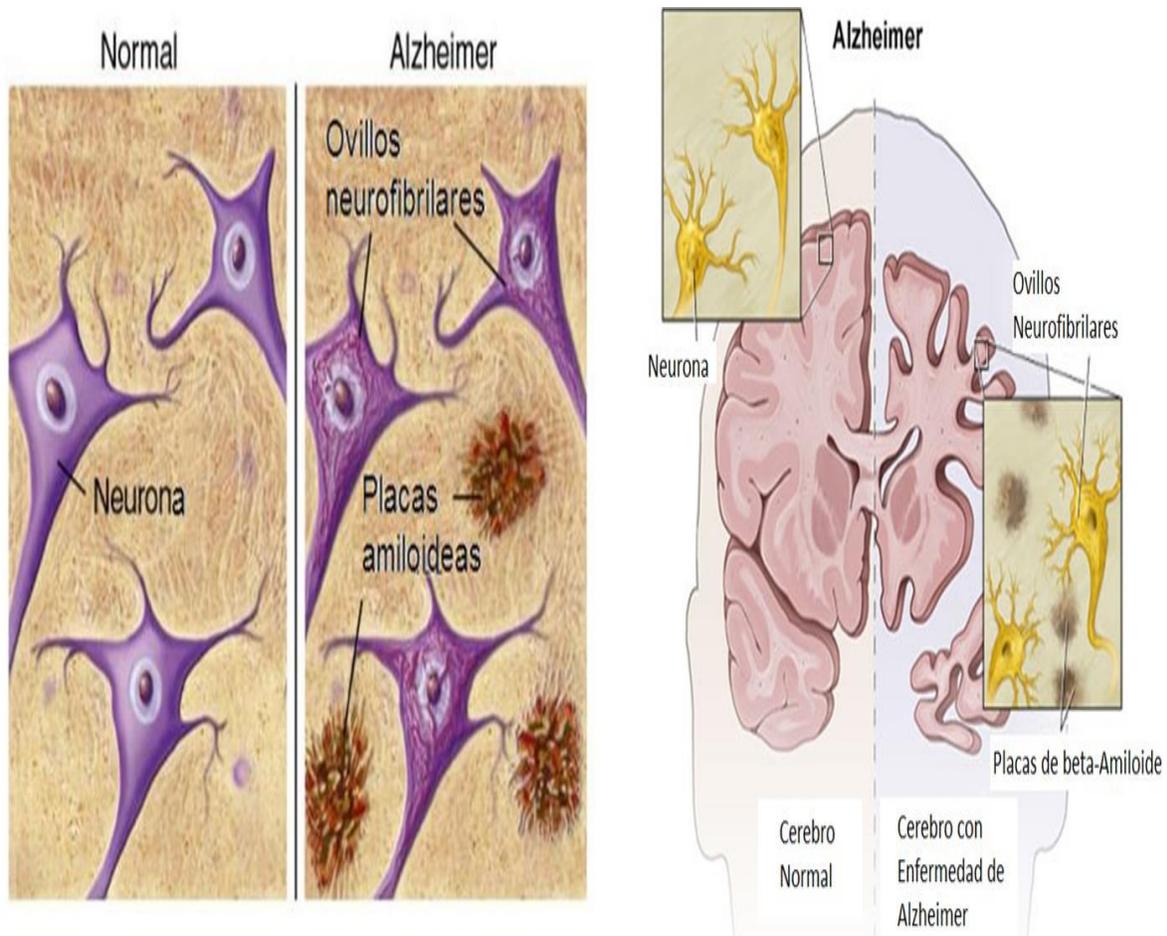


Figura 2 Histopatología de la Enfermedad de Alzheimer

Esta se caracteriza por la presencia de depósitos de proteína A β (1-42) llamadas placas seniles y los depósitos neuronales causados por la proteína *Tau* hiperfosforilada llamados marañas neurofibrilares; estas dos patologías generan daño tisular y lesiones en el cerebro.



1.2 Amiloide- β (1-42) en la Enfermedad de Alzheimer

Actualmente la hipótesis que más ha tomado auge en la fisiopatología de la EA, es la denominada cascada del A β , la cual propone que esta proteína inicia una cascada de eventos como estrés oxidativo, respuesta inflamatoria y alteraciones en la formación de proteínas que conducen a la neurodegeneración y desarrollo de la enfermedad (Pratico, Uryu, Leight, Trojanoswki, & Lee, 2001).

El Amiloide- β es un péptido de longitud variable de 40 a 43 aminoácidos con un peso de 4-6 kD (Tatarnikova, Orlov, & Bobkova, 2015), el A β (1-42) es el resultado del proceso proteolítico de la proteína precursora del Amiloide (APP, por sus siglas en inglés) (Payami et al., 2003). La APP es una proteína transmembranal tipo 1 altamente conservada que posee un dominio extracelular amino-terminal largo y un dominio citoplásmico intracelular corto, cuya expresión está localizada principalmente en torno a la sinapsis de tejido neuronal; aunque su función principal no se entiende completamente, es crucial para la plasticidad neuronal y la formación de sinapsis (Nhan, Chiang, & Koo, 2015; Zheng & Koo, 2006), incluso se encuentra en muchos tipos de células y varios tejidos, como el endotelio, la glía y neuronas del cerebro (Schmechel et al., 1988). Además de que cumple múltiples funciones a nivel celular tales como el metabolismo del colesterol, adhesión celular y transporte axonal (Turner, O'Connor, Tate, & Abraham, 2003), por lo cual juega un papel esencial en la EA (Deyts, Thinakaran, & Parent, 2016). Existen tres isoformas de esta proteína; las dos primeras, APP751 y APP770 son expresadas en poblaciones no neuronales y la isoforma APP695 se encuentra predominantemente en las neuronas (Zheng & Koo, 2011), esta última se dice que es la fuente de la acumulación de los péptidos A β (1-42), los cuales se acumulan en las placas seniles en el cerebro y por tanto recibe mayor atención en la investigación sobre la EA (Tanaka et al., 1989).



En el proceso proteolítico de la proteína APP se da en dos vías (Vía Amiloidogénica y la Vía No-Amiloidogénica) en las que participan enzimas llamadas secretasas (α -, β - y γ -). Cerca de la membrana celular se dan dos principales sitios de escisión proteolítica (α - ó β - secretasa) y dentro del dominio transmembranal se ha identificado otro sitio de escisión (γ - secretasa).

En las vías proteolíticas de APP, la vía No-Amiloidogénica es iniciada por α -secretasa (**Figura 3**). El término no amiloidogénico se refiere a su naturaleza no agregante a diferencia de las proteínas amiloidogénicas que tienden a agregarse (Howlett, Simmons, Dingwall, & Christie, 2000).

El sitio de escisión de APP para α - secretasa se produce muy cerca de la superficie de la membrana celular, de este modo interrumpe la liberación de longitud completa $A\beta$ -40/42. El resultado de esta proteólisis es la liberación extracelular de un fragmento largo, al que se le denomina APP- α soluble (α -APPs) y un fragmento C-terminal de 83 aminoácidos que queda en la membrana (CTF, por sus siglas en inglés, 83). Está documentado que el fragmento α -APPs tiene efectos neuroprotectores y neurotróficos (Cappai, 2014; Thinakaran & Koo, 2008). Después de la escisión inicial por α -secretasa, el CTF-83 es procesado por γ -secretasa para liberar un dominio intracelular de amiloide (AICD, por sus siglas en inglés) y una forma truncada del péptido $A\beta$ que es un fragmento llamado P3 (también referido como $A\beta$ 17-40/42), se cree que ambos tienen algún efecto biológico sobre la función neuronal, aunque los mecanismos exactos aun no son claros (Cappai, 2014; Szczepanik, Rampe, & Ringheim, 2001; Zheng & Koo, 2006).

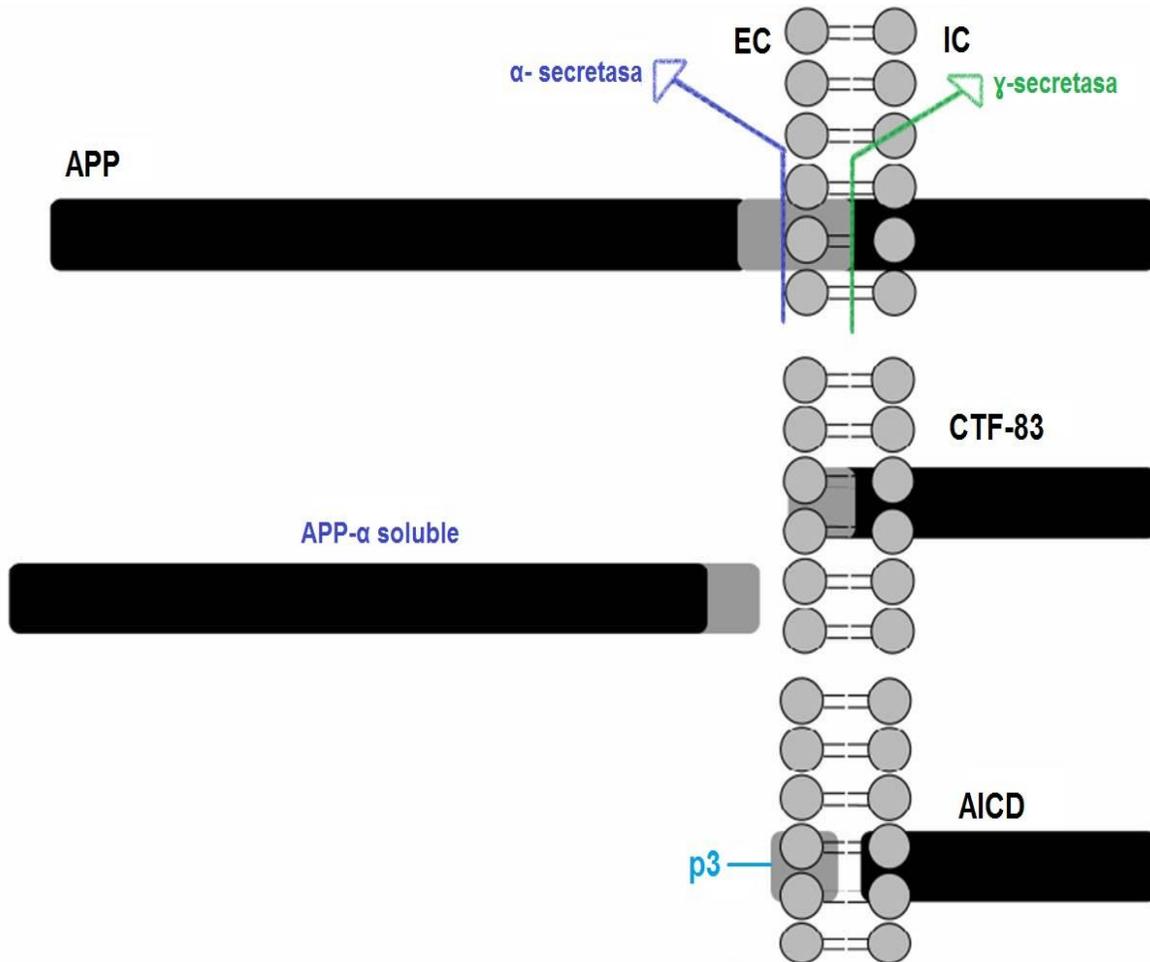


Figura 3 Representación esquemática de la Vía No-Amiloidogénica

Cuando α -secretasa corta a APP en el dominio extracelular (EC), se libera APP- α soluble; por otro lado, en la membrana queda un fragmento C-Terminal de 83 aminoácidos (CTF-83). Del mismo modo γ -secretasa al procesar el CTF-83, libera un dominio intracelular de amiloide (AICD) y la proteína truncada de A β llamada p3. Modificada de (Mohamed, Shakeri, & Rao, 2016).

Por otro lado la Vía Amiloidogénica se refiere a la proteólisis de APP por β/γ secretasa, ya que liberan el péptido A β (1-42) (**Figura 4**). Hay que destacar que ambas vías proteolíticas de APP son parte de la fisiología normal y que los cerebros sanos tienen mecanismos de procesamiento post-APP eficaces para manejar los subproductos (Liu et al., 2009; Sambamurti, Greig, & Lahiri, 2002). Dicho esto, se ha reportado que la vía Amiloidogénica está implicada en la patogénesis de la EA (Cai et al., 2001; Mattson, 2004).



El sitio de escisión de APP por β -secretasa produce un fragmento de β -APP soluble (β -APPs), que es menor en comparación con la cantidad de α -APPs que se libera pero de igual forma cumple la función de neuroprotector; también se produce en la membrana un fragmento C-terminal de 99 aminoácidos (CTF-99) que da lugar a los péptidos de A β (Menting & Claassen, 2014; Suh & Checler, 2002). El CTF-99, se procesa de manera similar a CTF-83, por γ -secretasa y libera un fragmento de dominio intracelular de amiloide (AICD) y el fragmento completo de A β (1-40/42); cabe destacar que ambos fragmentos (A β (1-40) y A β (1-42)) son liberados al líquido Cerebroespinal (LCE) (Selkoe, 1993, 2001).

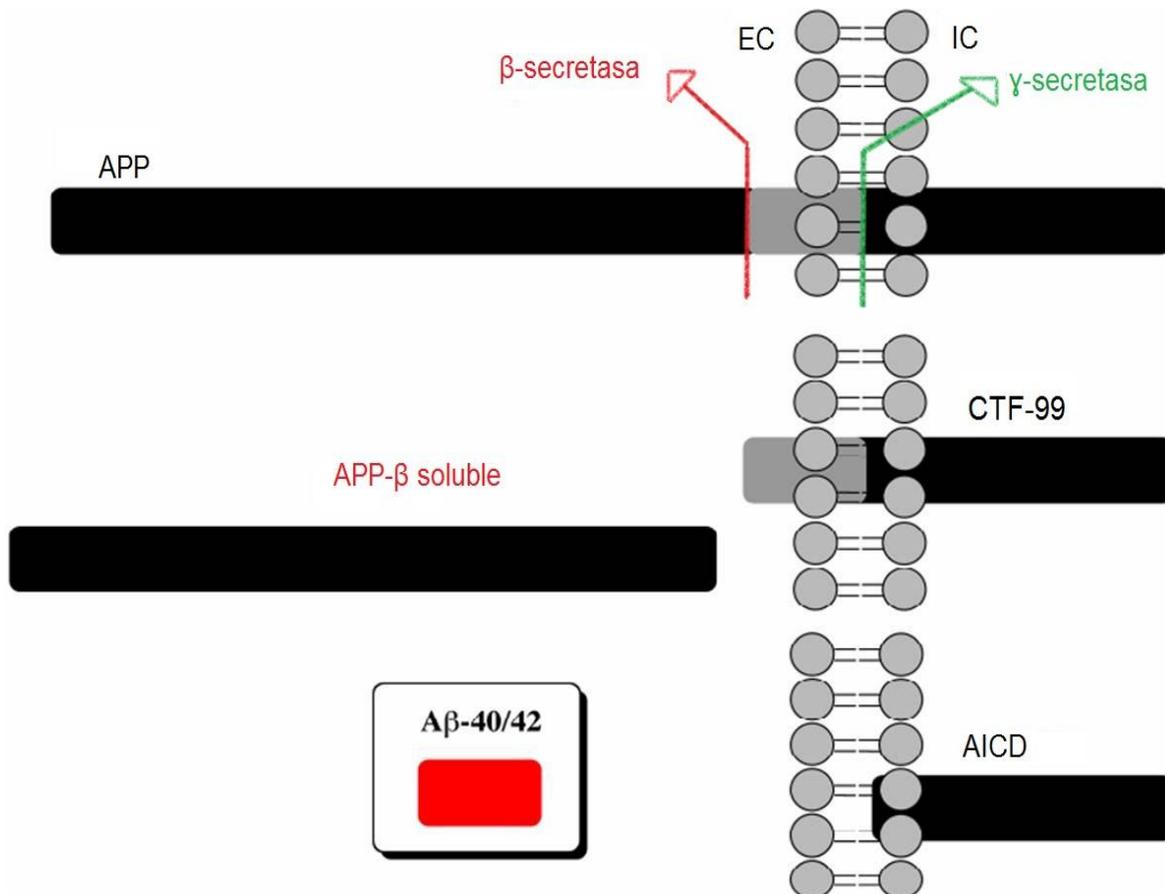


Figura 4 Representación esquemática de la Vía Amiloidogénica

Cuando β -secretasa corta a APP en el dominio extracelular (EC), se libera APP- β soluble, de este modo en la membrana queda un fragmento C-Terminal de 99 aminoácidos (CTF-99). Por otro lado γ -secretasa al procesar el CTF-99, libera un dominio intracelular de amiloide (AICD) y a la proteína A β . Modificada de (Mohamed et al., 2016).



El A β (1-40) es más soluble y se agrega lentamente, por lo cual puede ser degradado de manera eficiente; y a pesar de que el A β (1-42) se produce en menor proporción, muestra un incremento significativo en su producción en ciertas formas de la EA (Naslund et al., 1994).

1.3 Amiloide- β (1-42) en la fisiopatología de la Enfermedad de Alzheimer

Tanto el A β (1-40) como el A β (1-42) son fragmentos que constituyen el elemento más importante en las placas neuríticas; sin embargo se ha visto que dichas placas son agregados formados principalmente del A β (1-42) (Harrington, 2012). La única diferencia entre estas dos proteínas es que el A β (1-42) tiene dos aminoácidos más hidrofóbicos, comparado con el A β (1-40) facilitando el β -plegamiento, lo cual promueve la formación de fibrillas. Es por esta razón que A β (1-42) es más tóxico (Butterfield, Swomley, & Sultana, 2013). Posiblemente el incremento de la hidrofobicidad de A β (1-42) permite a este péptido integrarse a la bicapa lipídica iniciando el proceso de daño celular (Butterfield et al., 2013). Estudios previos han reportado que la forma A β (1-42) es tóxica para las neuronas (S. D. Yan et al., 1996) así como para las células gliales (Coria & Rubio, 1996).

El mecanismo de toxicidad que más se ha descrito para A β (1-42), está dado por la activación excesiva del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) (excitotoxicidad); lo que resulta en la producción de niveles excesivos de Óxido Nítrico (NO, por sus siglas en inglés). Este proceso ha sido implicado como un mecanismo patológico que subyace a la neurodegeneración mediada por A β en la EA. Estas alteraciones provocan mal plegamiento protéico y fragmentación mitocondrial; liberando citocromo C y activando las vías de las caspasas (Gotz, Eckert, Matamales, Ittner, & Liu, 2011) (**Figura 5**), lo que permite el deterioro de los procesos de memoria y aprendizaje (Selkoe, 1996).

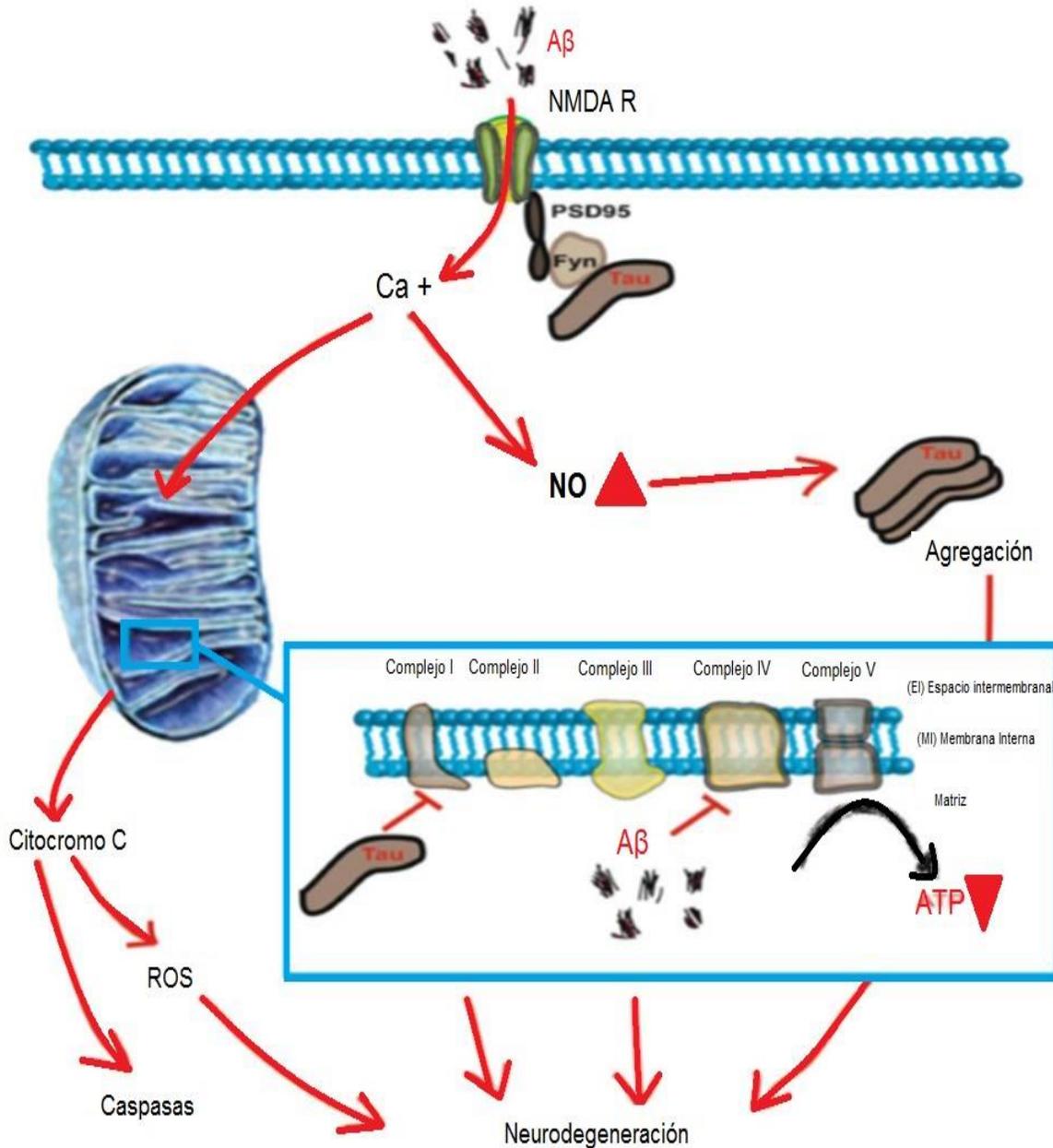


Figura 5 Mecanismo general de la toxicidad de Aβ (1-42) en las neuronas

El exceso de activación de los complejos del receptor NMDA (excitotoxicidad) da como resultado niveles excesivos de óxido nítrico (NO). Esto genera posteriormente el mal plegamiento de proteínas y la agregación, así como la fragmentación mitocondrial. La vía de señalización tóxica también implica la liberación de citocromo C mitocondrial y la activación de caspasas, así como la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO). El complejo de excitotoxicidad es mediado por las funciones tóxicas de Aβ y posteriormente la neurodegeneración, es un proceso que depende también de la presencia de *tau*. Modificado de (Gotz et al., 2011).



1.4 Amiloide β (1-42) y el Óxido Nítrico

El NO es una molécula diatómica, hidrofóbica, altamente reactiva, que se difunde a través de las membranas celulares de acuerdo a su gradiente de concentración (Baranano & Snyder, 2001). Para su síntesis se requiere al aminoácido L-arginina y a la Óxido Nítrico Sintasa (NOS), de la que se han descrito tres isoformas (Liao et al., 2014): 1) la Óxido Nítrico Sintasa neuronal (nNOS), que se ha relacionado con la formación de los circuitos cognitivos y del lenguaje (Funk & Kwan, 2014); 2) la Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS) sintetiza el NO que participa en la estabilización y regulación del microambiente vascular (de la Torre & Stefano, 2000), además de regular la producción del A β (Austin, Santhanam, & Katusic, 2010); y 3) la Óxido Nítrico Sintasa inducible (iNOS) cuyo NO sintetizado está asociado a la neurodegeneración y neurotoxicidad, además de estimular a los astrocitos (Simonian & Coyle, 1996) y la microglía (Lan et al., 2011).

Además se ha descrito que las neuronas muestran aumento en la síntesis de NO en presencia del A β (1-42) por activación de los receptores NMDA (de N-metil-D-aspartato), por fisión mitocondrial, pérdida sináptica y daño neuronal (Cho et al., 2009; Gotz et al., 2011). El aumento de NO se debe a una mayor expresión del eNOS y iNOS (Luth, Holzer, Gartner, Staufenbiel, & Arendt, 2001; Venturini et al., 2002), sin embargo, se ha sugerido que la isoforma con mayor actividad es la iNOS, debido a que el A β (1-42) inhibe fuertemente la actividad de la eNOS (Venturini et al., 2002).

También se ha descrito que en la EA las células de la microglía presentan aumento en la síntesis de NO mediante dos vías: la primera por la exposición al A β (1-42) (Zielasek, Tausch, Toyka, & Hartung, 1992); y la segunda por la inducción generada por el NO sintetizado en la neurona debido a la iNOS (Simonian & Coyle, 1996).



1.5 Amiloide β (1-42) como activador de la respuesta inmunológica

Se ha reportado que la neuroinflamación contribuye principalmente al desarrollo de la EA (Griffin, 2013); y numerosas evidencias sugieren que los depósitos de A β (1-42) desencadenan esta respuesta inflamatoria en el cerebro. La liberación inicial de las citocinas inflamatorias por la deposición de A β (1-42) conduce a mayor acumulación del mismo, incluso ha sido demostrado de manera *in vivo* e *in vitro* que el A β (1-42) desencadena la reacción inflamatoria en el cerebro de pacientes con EA (Kalaria et al., 1996).

También se ha descrito la relación entre la activación de la microglía y los depósitos del A β (1-42) (Itagaki, McGeer, Akiyama, Zhu, & Selkoe, 1989) así como la activación de los astrocitos en presencia de A β (1-42) (Okabe et al., 2012). La activación directa de los astrocitos y la microglia genera una cascada de liberación de radicales libres y diversas citocinas e interleucinas, primordialmente: TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 ((Morales, Guzman-Martinez, Cerda-Troncoso, Farias, & Maccioni, 2014; Szczepanik, Funes, Petko, & Ringheim, 2001). Además de que A β (1-42) parece estar relacionada con alteraciones en el metabolismo de la glucosa a nivel cerebral (Solerte, Cravello, Ferrari, & Fioravanti, 2000). La liberación de las citocinas ya mencionadas, es observada en el cerebro de pacientes con la EA y también ha sido mostrada en el suero (Swardfager et al., 2010); así mismo, estos cambios en los niveles de las concentraciones séricas de las citocinas han sido asociados al drenaje de A β (1-42) desde el cerebro al suero por un mecanismo de drenaje del antígeno (Weller, Djuanda, Yow, & Carare, 2009). El drenaje de A β (1-42) en el suero, ha sido demostrado por la presencia de anticuerpos específicos anti-A β (1-42) en el suero de ratas administrados con oligómeros de A β (1-42) en el hipocampo (Dalgediene et al., 2013). Dentro de la respuesta inmunológica también se ha descrito la participación de componentes endocrinos, del sistema del Complemento y la participación de células endoteliales, las cuales son activadas por las citocinas liberadas por las células del Sistema Nervioso Central (SNC) y por depósitos del A β (1-42) en la vasculatura (Broussard, Mytar, Li, & Klapstein, 2012).



1.6 Drenaje antigénico del Amiloide β (1-42)

Algunas investigaciones han sustentado el hecho de encontrar A β (1-42) en el suero de pacientes con la EA asociado al drenaje antigénico (Laman & Weller, 2013). El drenaje antigénico es el proceso mediante el cual antígenos solubles pasan del SNC a los ganglios linfáticos para su presentación ante células especializadas como los linfocitos T (**Figura 6**). Este proceso se da a través de dos vías; la primera de estas es el drenaje del LCE presente en el espacio subaracnoideo a través de las placas cribiformes, para seguir el trayecto de los nervios olfatorios que drenan en los ganglios linfáticos nasales; la segunda vía es el drenaje del LCE hacia el Líquido Intersticial (ISF) para posteriormente llegar al sistema linfático, para lo cual el A β (1-42) circula en el espacio perivascular cerebral hasta llegar a los pares craneales o a la carótida interna. Ambas rutas terminan en los ganglios linfáticos cervicales o en el torrente sanguíneo donde el A β (1-42) es llevado al bazo y a otros órganos donde residen células especializadas en la respuesta inmune (**Figura 7**) (Laman y Weller, 2013).

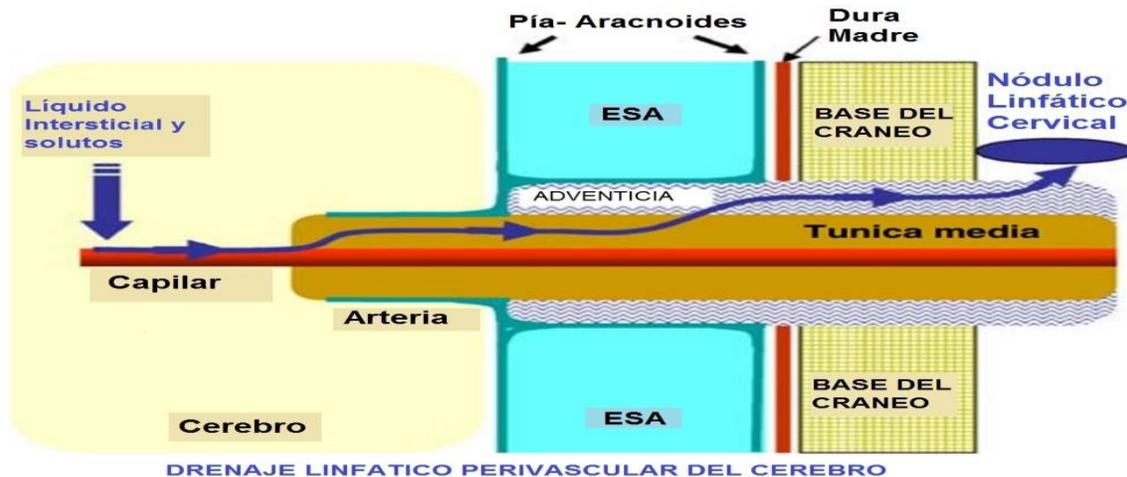


Figura 6 Ruta propuesta para el drenaje antigénico por la vía del drenaje linfático

El Líquido Intersticial (ISF) y los solutos fluyen hacia los capilares; posteriormente el LI se extravasa hacia la adventicia para llegar al espacio subaracnoideo (ESA), posteriormente seguirá a través de la red vascular de las meninges hasta la base del cráneo donde drenará hacia los vasos vertebrales, grandes vasos o directamente a los nódulos linfáticos cervicales. Modificado de (Weller et al., 2009).

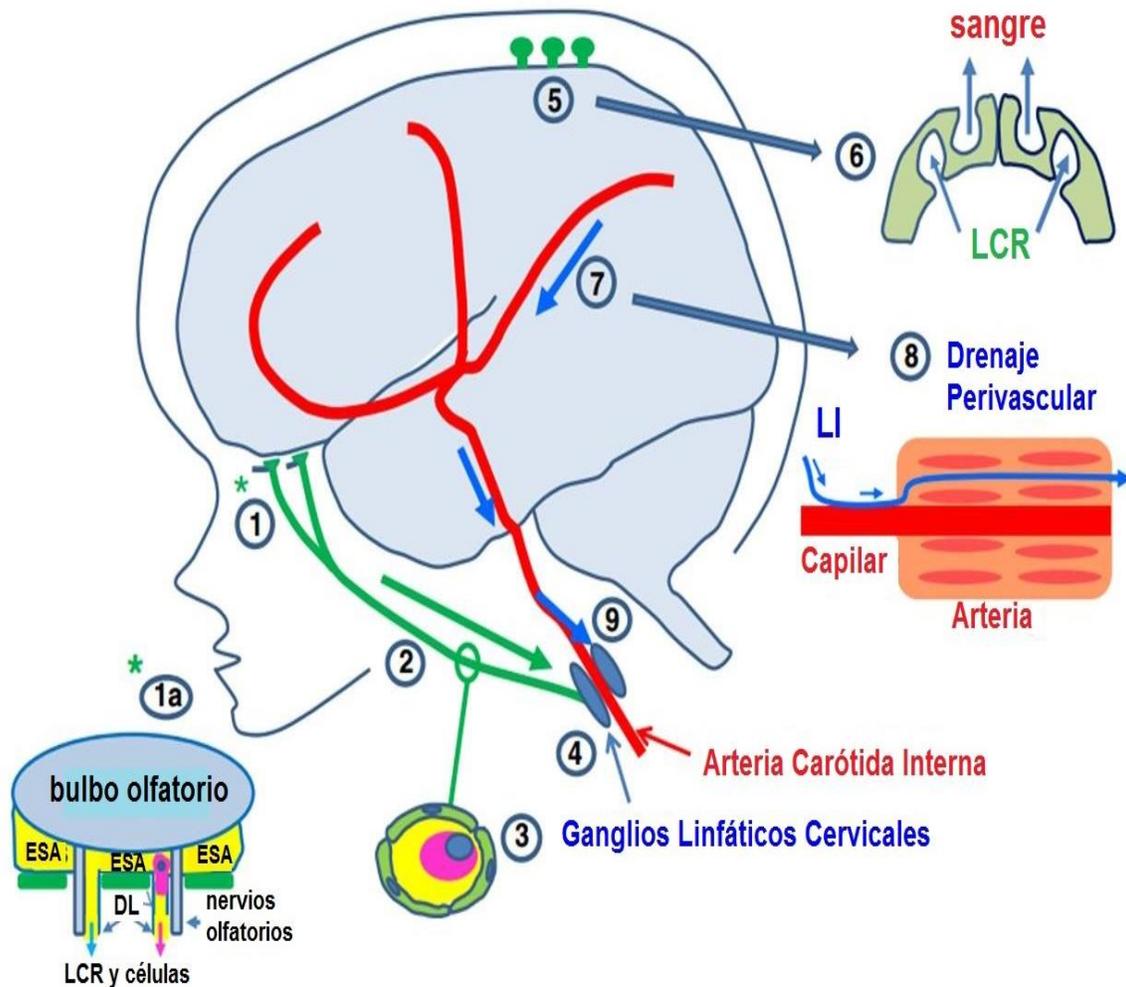


Figura 7 Drenaje linfático

Drenaje Linfático del Líquido Cefalorraquídeo (LCE). 1) El LCE drena desde el espacio subaracnoideo (ESA) a través de la placa cribiforme en los ganglios linfáticos nasales. 1a) una vista ampliada de la placa cribiforme muestra cómo pasan canales directos para el drenaje del LCE del espacio subaracnoideo junto a las ramas de los nervios olfatorios en la mucosa nasal. 2) Esta vía permite el drenaje de LCE y de las células presentadoras de antígenos. 3) Los vasos linfáticos convencionales llevan líquido y células, 4) a los ganglios linfáticos cervicales. 5) el LCE también desemboca en la sangre a través de las vellosidades aracnoideas y granulaciones por el transporte macromolecular 6) a través de las células endoteliales venosas.

Drenaje Linfático del Líquido Intersticial (LI). El LI drena del parénquima cerebral a lo largo de la vía perivascular 8) el LI y los solutos se difunden a través del espacio extracelular del cerebro. 9) los líquidos y solutos que se drenan en las paredes de las arterias cerebrales pasan a la pared de la arteria carótida interna en el cuello desde la cual drenan a los ganglios linfáticos cervicales. Modificado de (Laman & Weller, 2013).



Sin embargo en la EA no existe un proceso de eliminación exitoso, ya que se ha demostrado que el A β (1-42) puede formar acúmulos en el espacio perivascular por donde circula, generando angiopatía (**Figura 8**) (Weller, Massey, Kuo, & Roher, 2000). Esto puede contribuir al desarrollo de la EA al favorecer la acumulación del A β (1-42) en el cerebro y afectar la integridad vascular del tejido expuesto al A β (1-42), ya sea en el cerebro o a nivel periférico (Weller et al., 2009; Weller, Subash, Preston, Mazanti, & Carare, 2008).

Fallas en la eliminación de A β con la edad y en la Enfermedad de Alzheimer

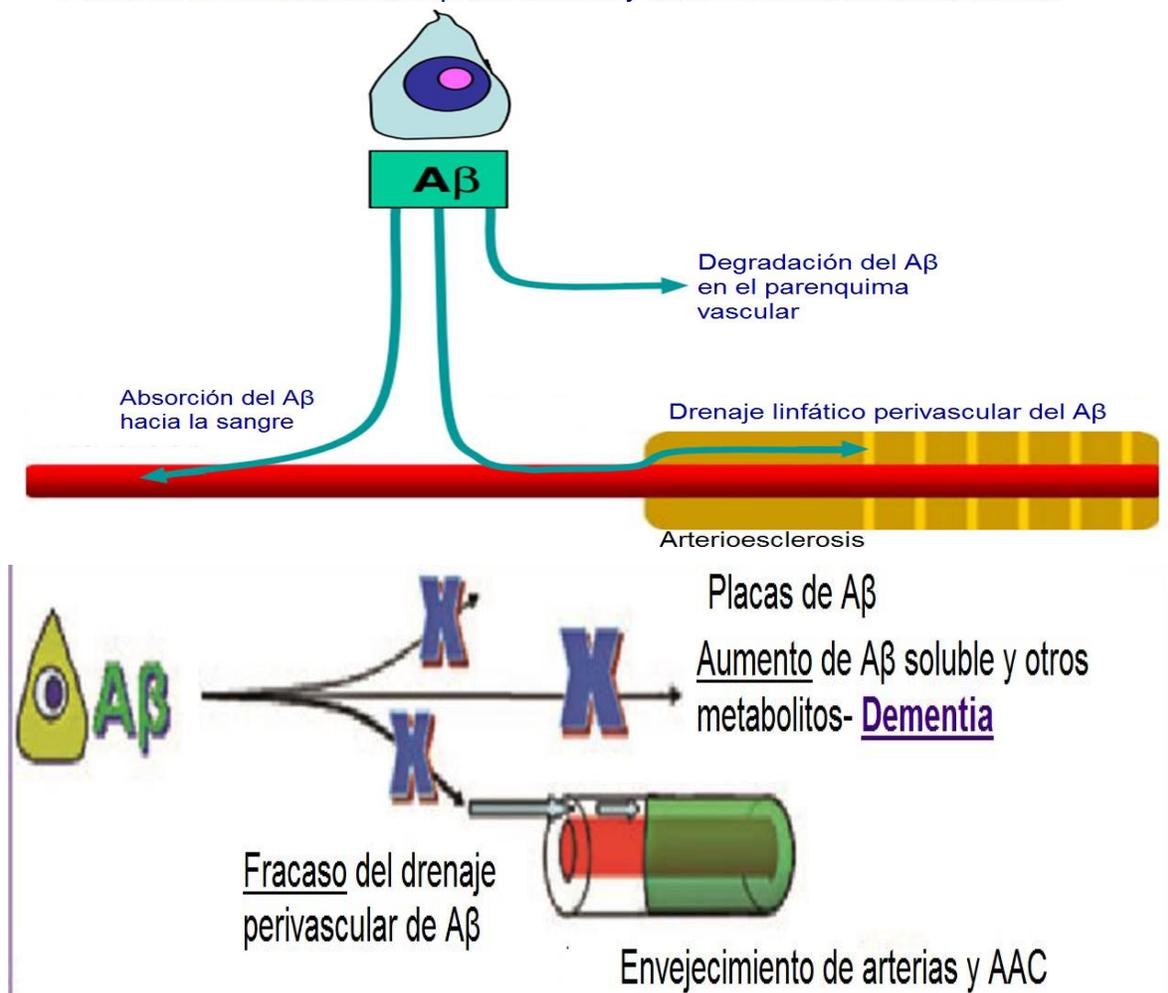


Figura 8 Vías de eliminación del A β (1-42) en el cerebro

La falta de eliminación del A β (1-42) provoca el aumento en el drenaje de A β (1-42) a espacios extracerebrales, el cual se da por drenaje linfático a través de la circulación en la adventicia de los vasos y drenaje directo a sangre. Modificado de (Weller et al., 2009).



1.7 Amiloide β (1-42) sérico

Debido a que la EA afecta al SNC, actualmente solo se aceptan como biomarcadores a la detección del A β (1-42) y la proteína tau en el LCE (Hawkins et al., 1994; McKhann et al., 2011). Actualmente la búsqueda de marcadores se extendió hacia otros tejidos, después del hallazgo de A β (1-42) a nivel sérico. Esta detección fue realizada por primera vez de forma indirecta con la detección del anticuerpo anti- A β sérico (Cole et al., 1989), los cuales se encuentran en niveles significativamente menores en pacientes con la EA que en personas sanas (Weksler et al., 2002).

1.8 Acción del Amiloide β (1-42) en las células endoteliales

Ante la presencia del A β (1-42) en suero, el tejido endotelial y el músculo están en exposición continua al péptido, pero se ha demostrado que la respuesta inducida por el A β (1-42) es mayor en las células endoteliales que en el músculo (Suo et al., 1998).

La actividad tóxica del A β (1-42) en el endotelio es diversa, ya que puede inhibir la proliferación celular endotelial (Grammas, Botchlet, Fugate, Ball, & Roher, 1995), aumentar la producción de EROs (Thomas, Thomas, McLendon, Sutton, & Mullan, 1996), así como cambiar la producción y actividad de las NOS (Zhu et al., 2007), además de generar depósitos en el tejido endotelial en vasos de diferente localización anatómica (Thomas, Sutton, Hellermann, & Price, 1997).

Los depósitos generados por el A β (1-42) en el tejido endotelial son extra o intracelulares, estos últimos están preferentemente en el retículo endoplásmico y mitocondria (Soriano, Galbete, & Forloni, 2003), dichos depósitos mitocondriales generan aumento en la producción y liberación de NO (Xu, Chen, Ku, et al., 2001). El aumento de NO producido por las células endoteliales ante la presencia del A β



(1-42) se ha relacionado con el aumento de la eNOS (Rajadas et al., 2013). Sin embargo se desconoce la presencia o producción de la iNOS producida por las células endoteliales ante la presencia del A β (1-42).

1.9 Amiloide β (1-42) y modelo animal

Por último para comprender mejor el comportamiento de A β (1-42) y otras proteínas involucradas en la EA, así como, en otros desórdenes relacionados con la demencia y los mecanismos que resultan en patologías (lesiones cerebrovasculares, enfermedad de Huntington, mal de Parkinson, etc.), se han desarrollado modelos de estudio, particularmente en ratones y ratas, los cuales son los que reproducen la mayoría de las características neuropatológicas (deterioro en la memoria y el aprendizaje) (Gotz et al., 2011).

En numerosos estudios *in vitro* con ratas y ratones se han utilizado péptidos sintéticos homólogos a A β (1-42), los cuales han mostrado toxicidad asociada con la capacidad de autoagregación del fragmento, así como el daño en la memoria y el aprendizaje y gracias a esto se definió que los efectos de A β se ejercen por el residuo de los aminoácidos 25-35, por lo que se reconoce a este fragmento como el dominio neurotóxico (Guo, Guan, Huang, Wang, & Shi, 2013); por lo cual el A β (25-35) es reconocido por conservar la actividad biológica, agregante y tóxica del A β (1-42) (Forloni et al., 1993; Inestrosa et al., 2002; Yankner, Caceres, & Duffy, 1990). Hoy en día, han sido descritos varios tamaños de A β . Pero sólo los fragmentos (25-35) y (1-42) están descritos como fragmentos de péptidos inmunorreactivos y neurotóxicos (Dalgediene et al., 2013).

En estudios previos realizados con ratas se han evidenciado cambios cerebrales posteriores a la administración en el hipocampo de A β (25-35) los cuales son similares a los presentados en pacientes con la EA, tales como: secreción de citocinas pro-inflamatorias (Browne et al., 2013), aumento de estrés oxidativo en



algunas horas (Rosales-Corral et al., 2004) y la pérdida de memoria después de la administración en el hipocampo de A β (25-35) (Ledo et al., 2013).

Sin embargo, se ha demostrado que los depósitos de A β en el modelo de rata no perduran por más de 30 días (Giovannelli, Casamenti, Scali, Bartolini, & Pepeu, 1995), por lo que se ha estudiado el tiempo transcurrido entre la administración del A β y la presencia de las alteraciones, arrojando datos interesantes como que el inicio en la alteración de la memoria se presenta a los 5 días (Limon et al., 2009), y en presencia de estrés oxidativo *in vivo* a las primeras horas (Tamagno et al., 2008). Investigaciones recientes en modelos *in vivo* e *in vitro* muestran que el péptido A β (25-35) tiene las propiedades neurotóxicas similares a las de la longitud completa A β (1-42) (Butterfield, 2003). Estas investigaciones con el uso de A β (25-35) en modelo de rata han permitido la comprensión de sus implicaciones en los mecanismos relacionados con la EA.



2 JUSTIFICACIÓN

¿El aumento del A β (1-42) puede inducir una respuesta pro-inflamatoria sistémica?

Se ha demostrado que un factor importante en la patogénesis de la EA es la relación que existe entre el estrés oxidativo y la respuesta neuroinflamatoria generada por el péptido A β (1-42) (Akiyama et al., 2000; Atwood et al., 2003; X. Z. Yan, Qiao, Dou, & Qiao, 1999); del mismo modo también se relaciona con la respuesta inmune sistémica (Akiyama et al., 2000; McGeer & McGeer, 2001).

A la fecha no se conoce el mecanismo por el cual A β (1-42) induce la respuesta inmune sistémica.

Posteriormente en un estudio se demostró la existencia de A β (1-40) y A β (1-42) circulante en el suero de pacientes con la EA, cuyos niveles séricos no presentan diferencias significativas entre los pacientes con la EA y los sujetos control (Irizarry, 2004); existiendo correlación entre las concentraciones séricas del A β (1-42) con las concentraciones del A β (1-42) en el LCR (Kasai et al., 2013). Por otro lado, en pacientes con DCL, los niveles séricos del A β (1-42) se encuentran elevados significativamente (Luis et al., 2009); por lo que sería posible encontrar cambios serológicos en los pacientes con DCL y con la EA en comparación con los sujetos sanos; ya que estos cambios pueden ser debido a las diferentes concentraciones del A β (1-42) sérico presente en cada etapa del desarrollo de la EA.

Por lo tanto estudiar las citocinas involucradas en los mecanismos neuroinflamatorios (IL-6, IL-10, IL-17, TNF- α e IFN- γ) y su relación con el estrés oxidativo en un modelo animal, contribuirá a entender cómo se llevan a cabo estas respuestas en relación con la EA (Gotz et al., 2011)



3 OBJETIVO

3.1 Objetivo general

Evaluar los niveles de las citocinas inflamatorias en el suero de un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer, así como la relación con el estrés oxidativo al inyectar A β (25-35).

3.2 Objetivos particulares

- a) Demostrar la presencia de A β (25-35) en el hipocampo de las ratas tratadas.
- b) Determinar la concentración sérica del A β (25-35), el óxido nítrico y las citocinas inflamatorias en las ratas inyectadas con A β (25-35)
- c) Detectar la presencia de la respuesta inmunológica sistémica mediante la determinación de los niveles séricos de las Interleucinas (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 y IL-17A) y el óxido nítrico, inducido por la presencia de A β suero posterior a la administración del A β (25-35) en hipocampo.
- d) Proponer que el modelo de rata podría ser útil para comprender la respuesta inmune sistémica generada por el A β (25-35) y la manera en la cual funciona en la EA.



4 MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Modelo animal

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso inicial de 200-220 gr (n=180), éstas fueron obtenidas del Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Los animales se mantuvieron en un ambiente de temperatura y humedad controlada en ciclos de luz-oscuridad 12h:12h con acceso libre a comida y agua. Todos los procedimientos descritos en este estudio están de acuerdo con la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del Consejo Mexicano para el Cuidado de Animales y bajo las condiciones señaladas por la NOM- 062- ZOO – 1999. Se hicieron todos los esfuerzos para minimizar el sufrimiento de los animales y reducir el número de animales utilizados.

4.2 Preparación de A β (25-35)

Se preparó una solución stock de A β (25-35) 4kD 1mM (A4559, Sigma Chem., USA) con agua estéril desionizada y posteriormente se incubó a 37° por 36 h, con el fin de agregar el A β , e inmediatamente inyectar en el hipocampo por métodos estereotáxicos.

4.3 Preparación de A β (25-35) “scrambled”

El A β (25-35) “scrambled” (A β s- SignalChem, Canada), fue reconstituido con agua desionizada hasta obtener una concentración de 5 μ g/ μ l; posteriormente se incubó a 37°C por 48 hrs con el fin de agregar el A β s e inyectarlo inmediatamente. El sA β tiene los mismos residuos de aminoácidos del fragmento A β (25-35) pero en diferente orden.



4.4 Cirugía Esterotáxica

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 10 grupos (18 ratas por grupo). Cada subgrupo fue subdividido en 3 subgrupos de 6 animales. Previo a la cirugía los animales fueron anestesiados con una mezcla de xylacina/ketamina a una dosis de 0.1ml/100gr de peso (**Figura 9**). La cirugía estereotáxica (con el equipo de cirugía estereotáxica (Stoelting, IL, USA) se realizó con el animal completamente anestesiado. Para esto se colocó a la rata en el estereotáctico de forma recta y se montaron los dientes incisivos superiores en el sujetador. Se colocaron los lápices del aparato en el canal auditivo externo de tal forma que la cabeza quedó inmóvil y el cuerpo alineado con el eje del estereotáctico. Se taladró el cráneo con una broca para hueso, de tal forma que el corte sólo llegó hasta la dura madre sin tocar el cerebro y se descendió el eje de las z's para bajar gradualmente hasta llegar a la parte del cerebro que se deseaba. Fue en esta parte donde se sometió al animal a una inyección bilateral en el hipocampo (coordenadas: (A) -4.2 mm de bregma, (L) -3.0 de línea media y -3.0 (V) de dura madre); con referencia a los atlas de Paxinos y Watson (Paxinos & Watson, 1998). De acuerdo a cada subgrupo se inyectó 1µl de solución salina (grupo control positivo) o 2 µl (10µg) de Aβs (grupo del control negativo) o 1µl (100µM) βA (25-35) (Diaz et al., 2010; Ford & Shorter, 2015) Todos los animales recibieron atención postquirúrgica.

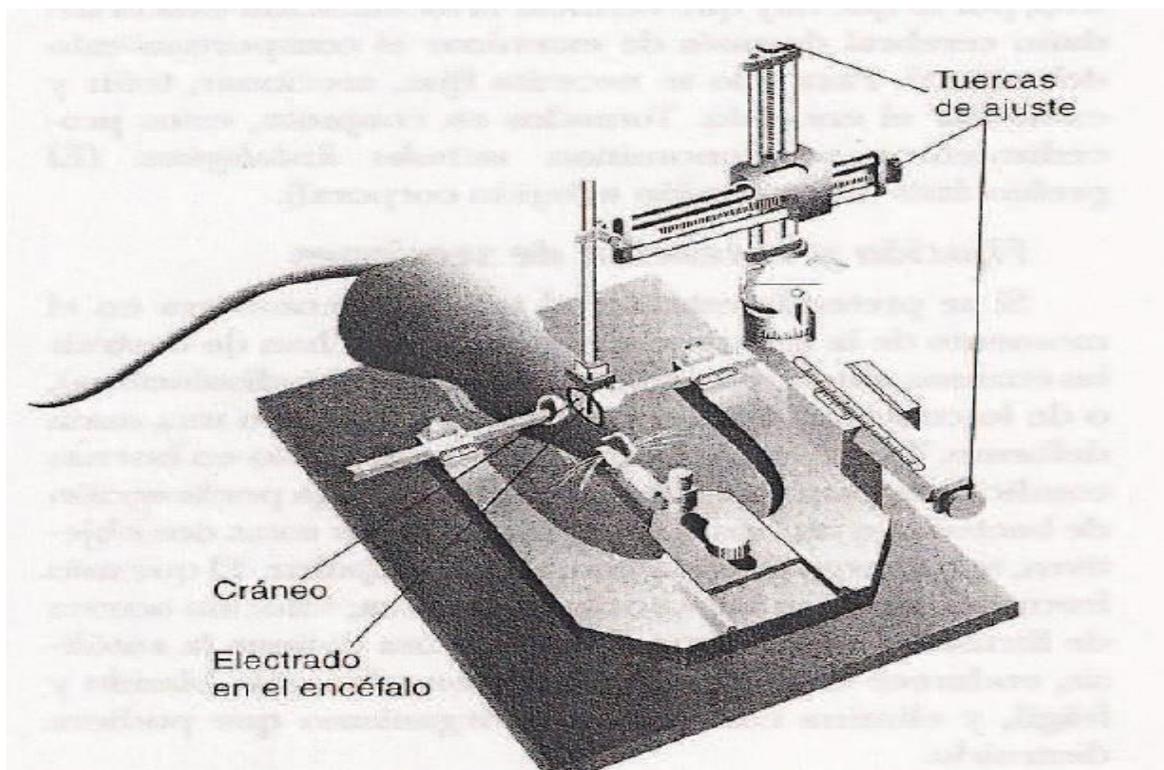


Figura 9 Cirugía Estereotáxica

Esta es una cirugía cerebral que utiliza un aparato estereotáxico para situar una cánula en un lugar específico del cerebro e inyectar sustancias. El aparato estereotáxico es el dispositivo que permite al cirujano situar una cánula en un lugar específico del cerebro. Consta de un soporte que inmoviliza la cabeza del animal en una posición establecida y un brazo que desplaza la cánula en los tres ejes espaciales a lo largo de distancias cuantificables.

4.5 Obtención de las muestras de hipocampo y sangre

Los animales de cada subgrupo fueron decapitados después de 45 min, 1.5, 3, 6, 12 hrs, 1, 7, 14 y 28 días, después de la inyección de A β (25-35), (control n=6, problema n=6). La sangre total arterial y venosa fue recolectada durante el proceso de decapitación en tubos de ensayo, se dejó coagular por 5 minutos a temperatura ambiente y se retiró el coágulo con ayuda de un aplicador de madera. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 2500 rpm por 8 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvo el suero y se almacenó a 70° C hasta su uso.



Por otro lado, el cerebro fue extraído y de un hemisferio el hipocampo fue disectado y homogenizado en 1 ml 0.1 M de PBS (*Phosphate Buffered Saline*), pH 7.4. El homogenizado se centrifugó a 12,500 rpm y 4° C por 30 min, posteriormente se colectó la fracción soluble y se cuantificaron las proteínas y los nitritos inmediatamente.

El otro hemisferio fue fijado en Formaldehido neutro al 40% diluido en PBS pH 7.4 y finalmente se ajustó a un pH de 6.8 con Na₂HPO₄ y fue incluido en parafina.

4.6 Inmunohistoquímica

Se realizaron cortes de 3-4 µm de los tejidos incluidos en parafina se eliminó de las secciones rehidratándolas mediante el uso de técnicas histológicas y luego se enjuagaron con una solución amortiguadora de PBS (Fosfato sódico 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,4). Para la inmunohistoquímica de Aβ (25-35) las secciones se lavaron a fondo en PBS y la peroxidasa endógena se inactivó mediante la incubación con H₂O₂ durante 20 minutos. Después de esto se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo monoclonal primario anti-Aβ (1: 200) (anti- rabbit) (Sigma- Aldrich, USA). El anticuerpo primario fue detectado utilizando un kit PolyVue Plus HRP/DAB Detection System (Diagnostic System). De este modo las secciones fueron teñidas con hematoxilina de Harris antes de montar. las imágenes fueron analizadas con el software Image-pro Plus 5.0.

4.7 Proteínas totales de la fracción soluble de hipocampo

Se realizó la cuantificación de proteínas en la fracción soluble obtenida a partir del hipocampo mediante la técnica de Lowry, utilizando el kit BioLegend Protein Assay Dc (BioLegend, USA), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La



determinación se realizó en micro-placa de 96 pozos y se preparó una curva estándar con albúmina sérica bovina (concentración máxima 8 g/dL, concentración mínima 5 g/dL). La técnica consiste en colocar 5 μ L de muestra o del estándar de albúmina sérica bovina, posteriormente se agregaron 25 μ L del reactivo A y 200 μ L del reactivo B. La reacción generada tendrá un viraje de color amarillo a color azul, esta reacción se deja estabilizar por 15 minutos a temperatura ambiente.

Por último se cuantificó la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm, mediante el uso de un lector de ELISA para micro-placas BioTeck ELx808 (Bio Tek, USA).

4.8 Nitritos séricos y de fracción soluble de hipocampo

Los nitritos séricos se cuantificaron a partir de la fracción soluble obtenida del lisado del hipocampo utilizando el método de Griess modificado para micro-placa de 96 pozos. Se utilizó el *kit* Griess Reagent System (Promega Corporation) que incluye su propia curva estándar. Dicho método consiste en colocar 50 μ l de muestra o del estándar (máximo 100 μ M), posteriormente se agregaron 50 μ l de sulfanilamida (1%) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, seguido a esto se agregó 50 μ l de la solución NED (N-1-naptilétilenediamina-dihidroclorhídrico) (0.1% en ácido fosfórico al 5%) y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, hasta el desarrollo de una coloración rosa. Todas las reacciones son sensibles a la luz, por lo que los tubos se procesaron en la oscuridad. La absorbancia se midió a 520 nm de longitud de onda en un lector de ELISA BioTeck ELx808 (Bio Tek, USA). Las concentraciones de nitritos en sobrenadante de hipocampo se calcularon por gramo de proteína.



4.9 Electroforesis

Las muestras séricas fueron sometidas a electroforesis. Dichas muestras se mezclaron en proporción 1:1 con buffer de muestra marca BioRad (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8 / glicerol 25%/ SDS 2%/ azul de bromofenol) (BioRad, USA) y colocadas durante un minuto en agua en ebullición; posteriormente se realizó la electroforesis en geles SDS-PAGE al 15% y de 1.5 mm de grosor. Se colocaron en cada carril 80 µg de proteína y el corrimiento se realizó a 120 V y 4° C durante 2 horas.

4.10 Transferencia

Terminada la electroforesis, los geles fueron transferidos a una membrana de nitrocelulosa mediante el uso de una cámara de transferencia semi-seca (BioRad, USA) a un voltaje de 20V durante 1 hora 20 minutos. Se verificó la transferencia mediante la tinción de la membrana transferida con rojo de Ponceau, seguido de lavados con PBS pH 7.4 para retirar el colorante.

4.11 Western Blot para la detección del Aβ e interleucinas

Posterior a la transferencia, la membrana se incubó en una solución de PBS pH 7.4 / 3% BSA a 4°C durante toda la noche, posteriormente se lavó por triplicado en PBS pH 7.4/ 0.01% Tween 20; se incubó con el anticuerpo para Amiloide-β y las diferentes interleucinas; policlonal goat anti- IL-17 IgG (1:100; Santa Cruz Biotechnology), policlonal goat anti- IL-6 IgG (1:100; Santa Cruz Biotechnology), policlonal rabbit anti- IL-10 IgG (1:100; Santa Cruz Biotechnology), policlonal rabbit



anti-TNF- α IgG (1:100; Santa Cruz Biotechnology), policlonal rabbit anti-IFN- γ R α IgG (1:100; Santa Cruz Biotechnology) y anti-Transferrina (1:500; Gene Tex) como control de carga en PBS pH 7.4/ 3% BSA/ 0.01% Tween 20 por 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de lavados por triplicado e incubado con anticuerpo secundario; Anti-Rabbit IgG HRP (Jackson Immuno, USA) y Anti-goat IgG HRP (Jackson Immuno, USA) según corresponde el caso, en una dilución 1:1000 en PBS pH7.4 / 0.01% Tween 20 por 30 minutos a temperatura ambiente y posteriormente lavado tres veces con PBS pH 7.4/0.001% Tween 20.

La detección se realizó por quimio-luminiscencia con SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) y se analizó la emisión de la señal utilizando el equipo DNI Bioimaging y el programa Gelquant versión 2.7.0 (Gelquant. DNI Bioimaging system, Jerusalem, Israel). El programa convirtió la imagen en una imagen de 8 bit y calculó la densidad del área en escala de pixeles/pulgada cuadrada, convirtiendo la lectura en un valor numérico expresado en *dots per point* (dpp).

4.12 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos acerca de las concentraciones de A β (25-35), nitritos e interleucinas fueron analizados en cada grupo por una prueba de ANOVA seguido por una prueba *post-hoc* Tukey. Estos análisis estadísticos fueron realizados usando el software GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA). Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.



5 RESULTADOS

5.1 Depósitos de A β (25-35) en el hipocampo y en suero

Como resultado del análisis inmunohistoquímico únicamente se encontró incremento significativo de la marca A β en el grupo de ratas inyectadas con A β (25-35) al día 14 post-tratamiento; mientras que en el grupo Control y A β s no se observó cambio alguno durante los diferentes tiempos de evaluación ($p < 0.0001$). Adicionalmente también se observó disminución en la celularidad de los tejidos provenientes de las ratas administradas con A β (25-35) en comparación con el grupo A β s (**Figura 10**).

Sorpresivamente los niveles de A β (25-35) en suero solo fueron detectables en el día 7 y a los 14 días después del tratamiento en las ratas administradas con A β (25-35) (datos no mostrados).

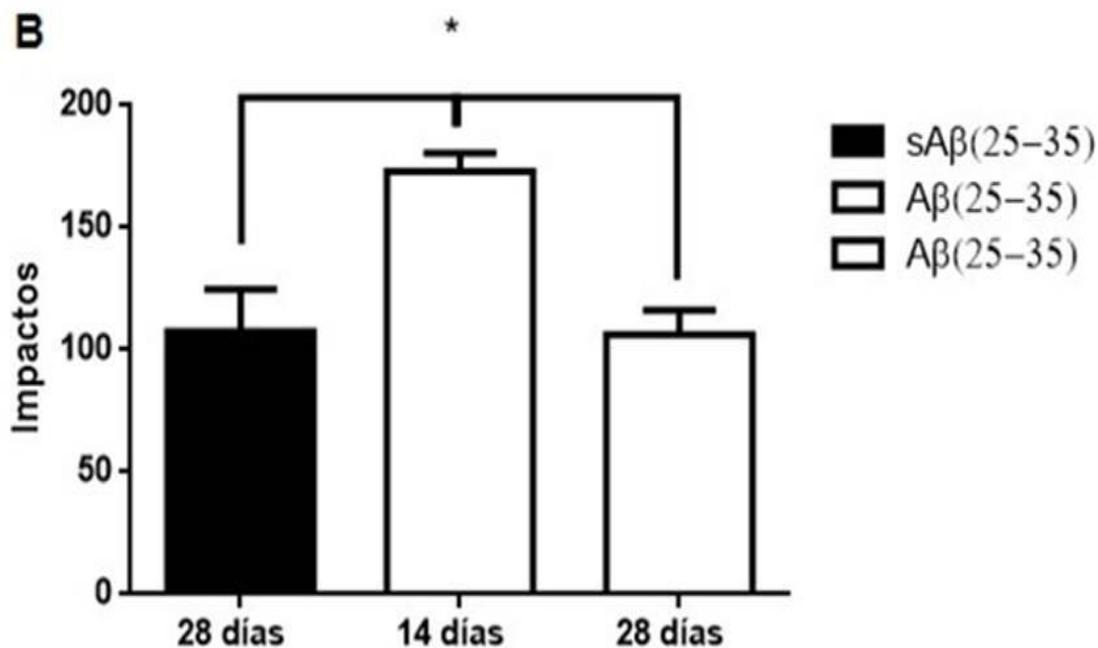
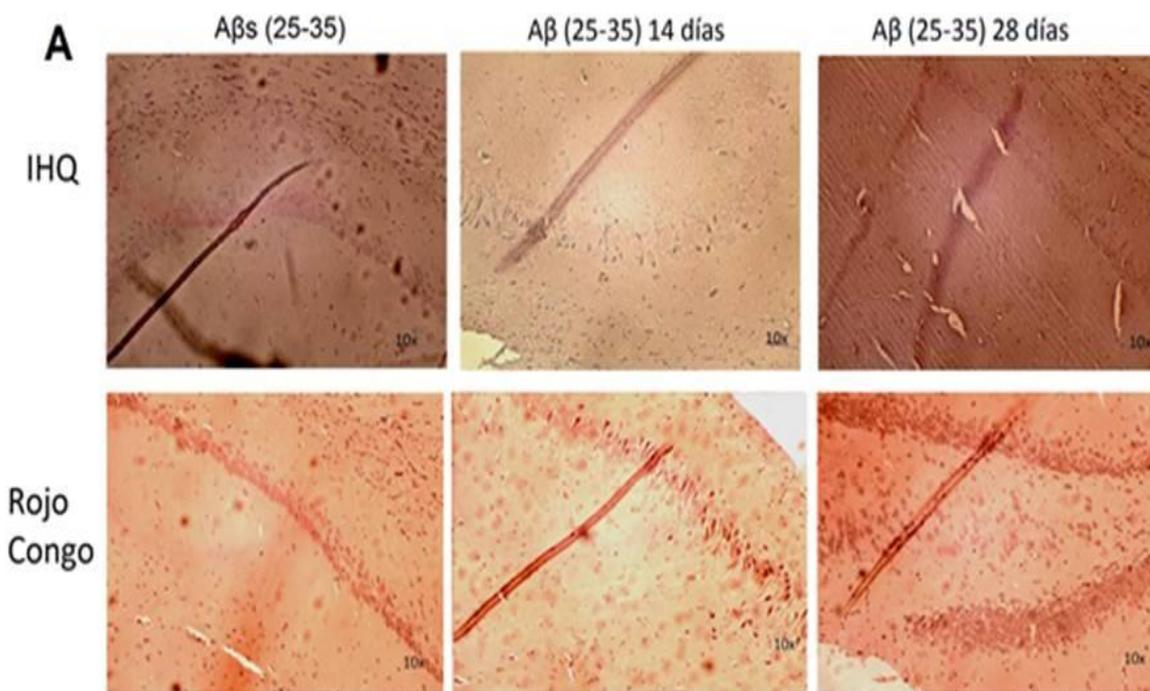


Figura 10 Detección del A β (25-35) en biopsias de hipocampo de ratas

A) Inmunohistoquímica (IHQ) y tinción con Rojo Congo; comparativa entre los subgrupos de ratas administradas con A β (25-35) a los 14 y 28 días post-tratamiento. B) Análisis cuantitativo de los depósitos de A β (25-35) en el hipocampo de rata (*=P<0.0001).



5.2 Óxido Nítrico en el Hipocampo

Por otro lado la concentración de nitritos en la fracción soluble obtenida de la lisis del hipocampo se incrementó de manera significativa en los grupos tratados con A β (25-35) a partir de las 1.5 hrs y hasta los 28 días post-tratamiento. ((1.5 hrs (p=0.0083), 3 hrs (p=0.0145), 6 hrs (p=0.0102), 12 hrs (p=0.0178), 1 día (0.0072), 7 días (p=0.0016), 14 días (p=0.0076), 21 días (p=0.0165) y 28 días (p=0.0051)), excluyendo al grupo de 45 min, el cual no mostró diferencias en los niveles de concentración de nitritos en comparación a los otros grupos (**Figura 11**).

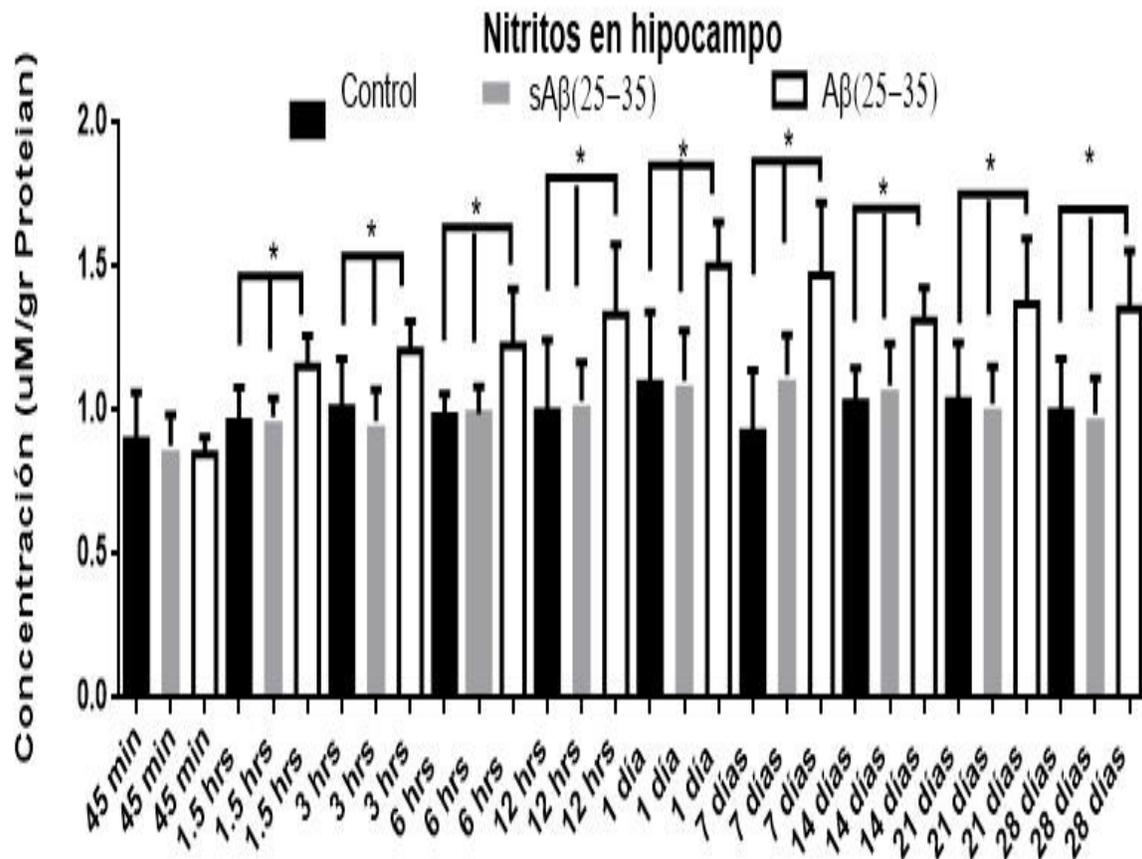


Figura 11 Concentración de nitritos

En la fracción soluble obtenida a partir de lisados de hipocampo de ratas tratadas con A β (25-35), se observa el incremento de nitritos en el grupo administrado con A β (25-35) a partir de las 1.5 hrs y hasta los 28 días post-tratamiento, mostrando la mayor concentración entre el día 1 y el día 14 (*=P<0.0001).



5.3 Óxido Nítrico Sérico

Los niveles en la concentración de nitritos en suero de las ratas administradas con A β (25-35), se incrementó significativamente después de las primeras 3 hrs, posterior a la administración hasta el día 14 (3 hrs p=0.0032, 6 hrs p=0.0040, 12 hrs p=0.041, día p=0.0001, días p=0.0061 y p=0.041 a los 14 días). Sorpresivamente, los tres grupos al día 21 muestran una concentración de nitritos idéntica, mientras que los animales tratados con A β (25-35), mostraron disminución significativa a los 28 días en comparación con los otros grupos (p=0.0001) (Figura 12).

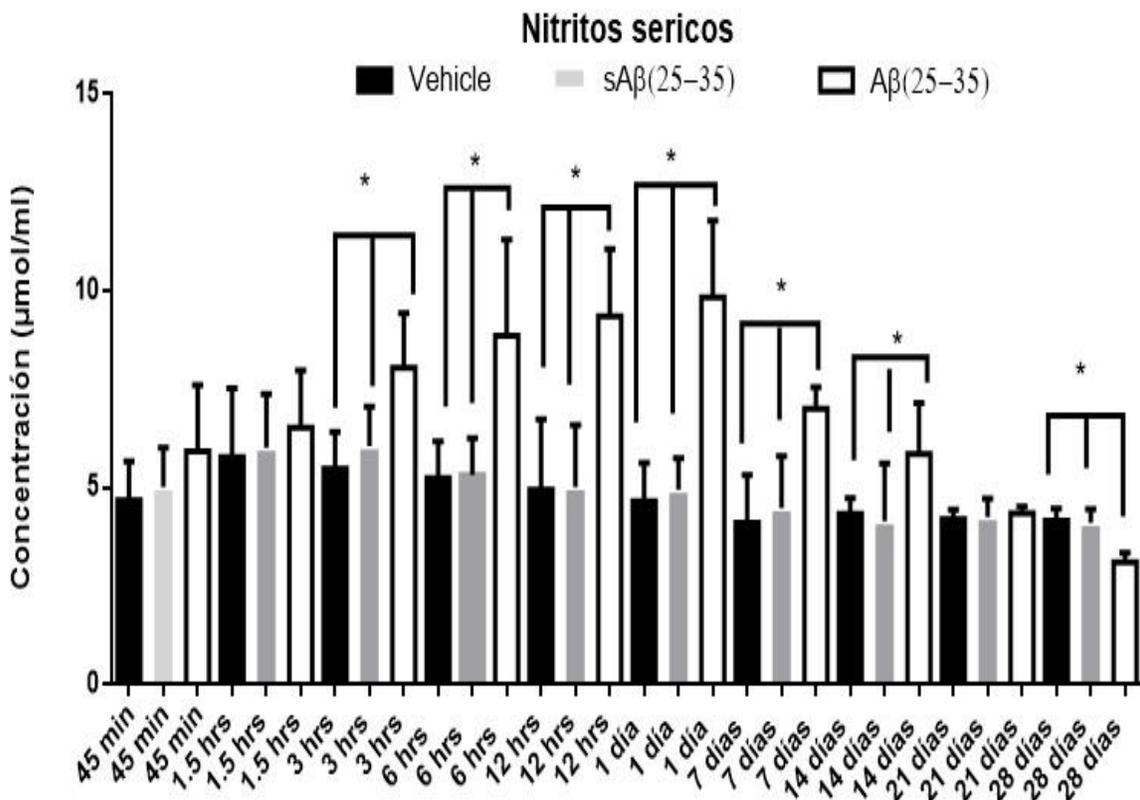


Figura 12 Concentración de nitritos séricos

En las ratas tratadas con A β (25-35) se incrementó la concentración de nitritos en el suero de las ratas tratadas con A β (25-35) muestra niveles significativamente altos a partir de las 3 horas y hasta los 14 días. *=P<0.0001.



5.4 Interleucinas

Las interleucinas (IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10 y IL-17) se midieron en muestras de suero de ratas tratadas con A β (25-35) a través de ensayos de Western blot.

Con relación al IFN- γ , este se incrementó en los subgrupos administrados con A β (25-35) a los 7 y 14 días post-tratamiento ($p=0.02815$ y $p=0.0287$, respectivamente) (**Figura 13**).

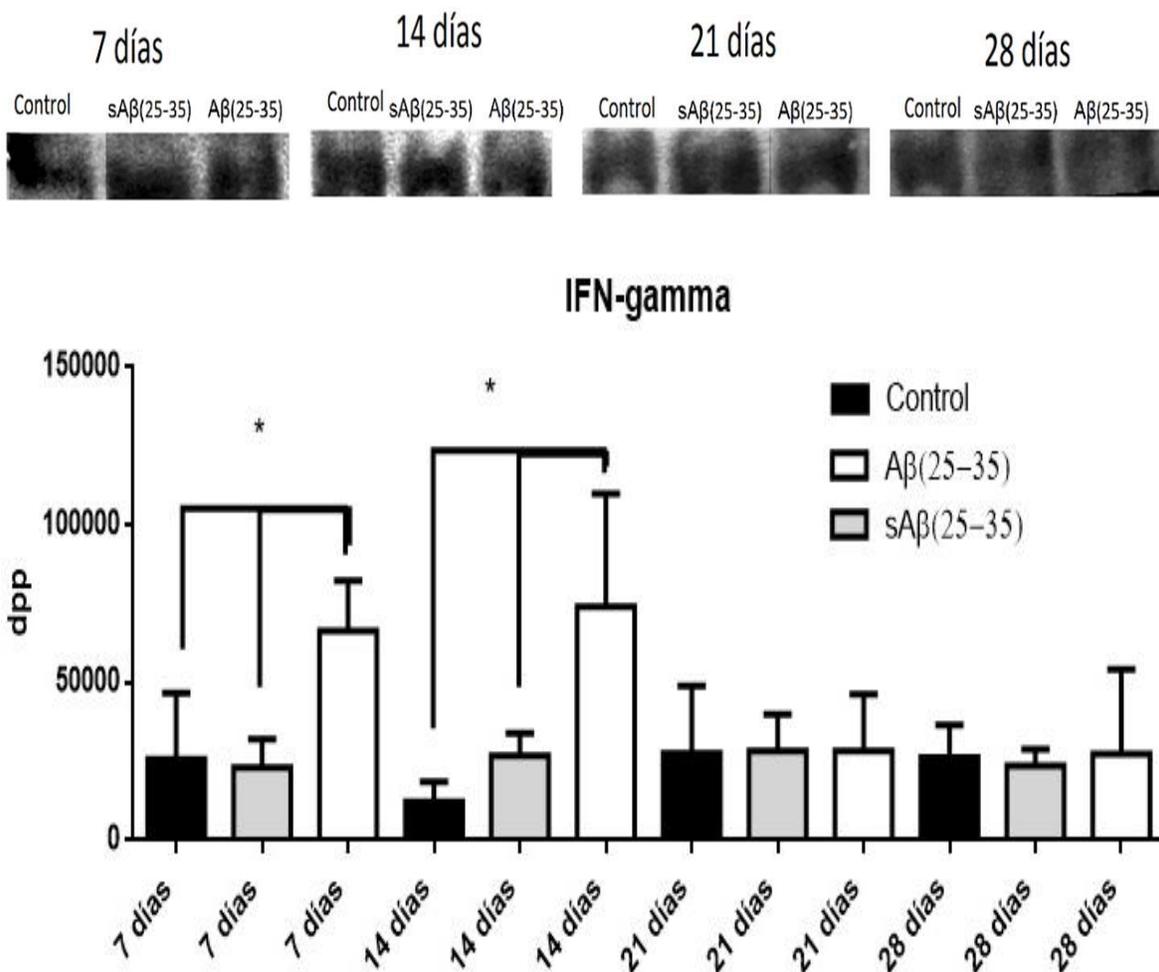


Figura 13 Cambios en los niveles de IFN- γ sérico

Se muestra el incremento estadísticamente significativo de IFN- γ en el suero de las ratas tratadas con A β (25-35) a los 7 días y hasta los 14 días después del tratamiento. Se utilizó transferrina como control de carga.



TNF- α e IL-6 se incrementaron a los 21 y 28 días después de aplicar el tratamiento (TNF- α : 21 días $p=0.0222$ y 28 días $p=0.0413$ e IL-6: 21 días $p=0.0197$ y 28 días $p=0.0168$) (Figura 14).

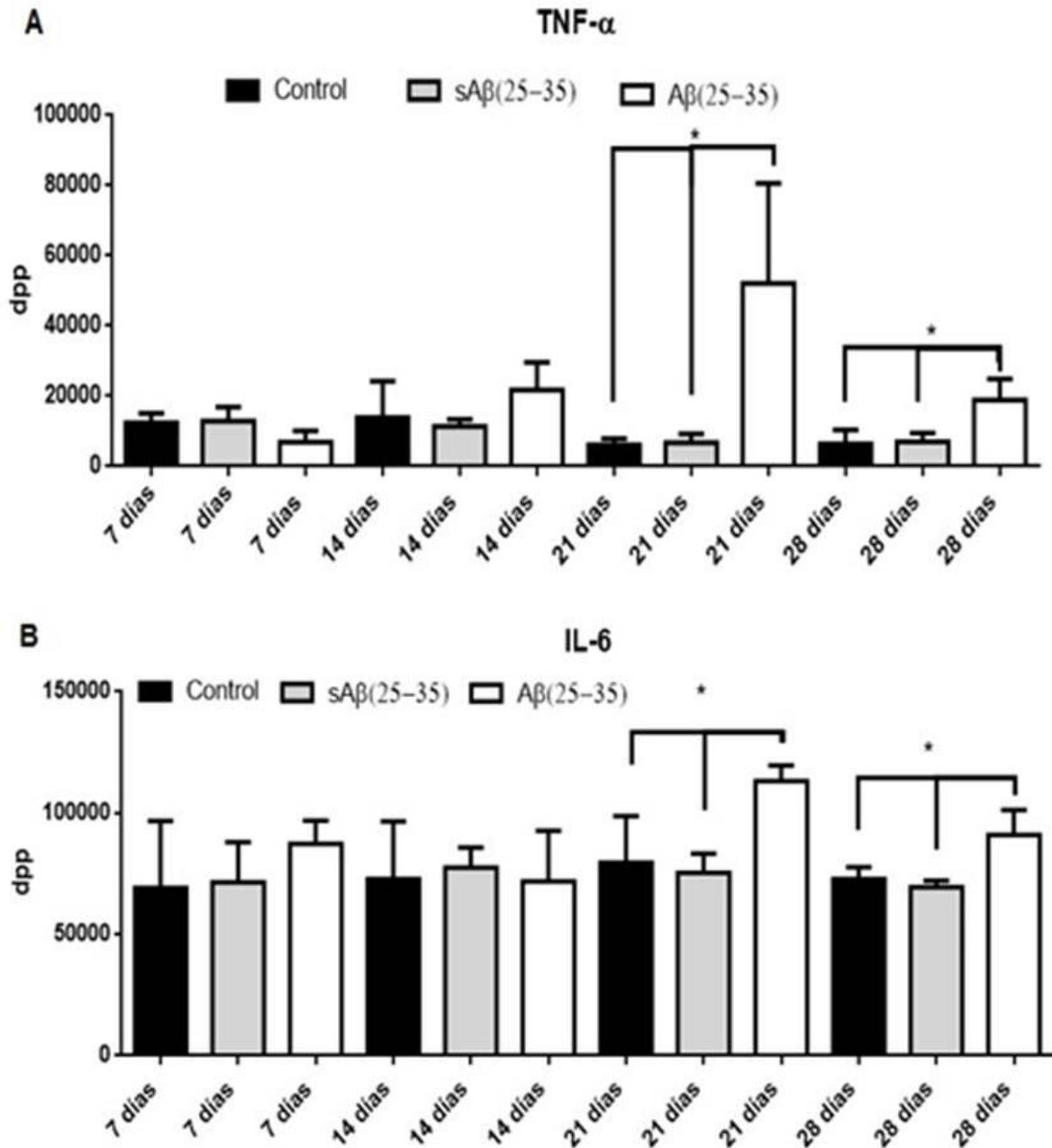


Figura 14 Cambios en los niveles de TNF- α e IL-6 séricos

Se muestra el incremento significativo de TNF- α (A) y de IL-6 (B) en el suero de las ratas tratadas con A β (25-35) a los 21 y 28 post-tratamiento.



Se detectaron niveles séricos de IL-17 a los 14 días post-tratamiento, seguido por un incremento estadísticamente significativo a los 21 y 28 días ($p=0.0023$ y $p=0.0035$) (**Figura 15**)

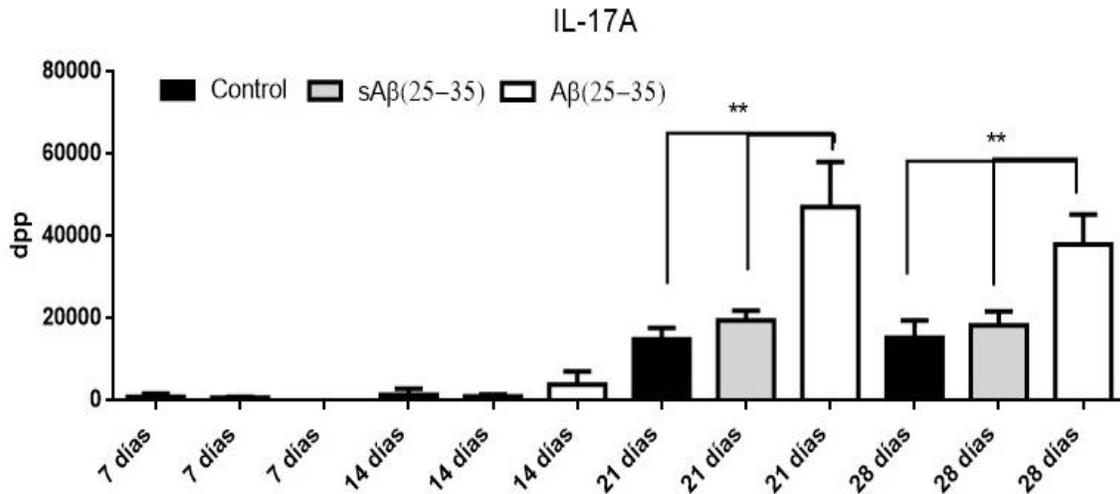


Figura 15 Cambios en los niveles de IL-17 sérico

Incremento de la IL-17 en el suero de las ratas tratadas con Aβ (25-35) a los 14 días y posteriormente un incremento estadísticamente significativo a los 21 y 28 días después del tratamiento.

No hubo cambios significativos de IL-10 en ningún subgrupo (**Figura 16**).

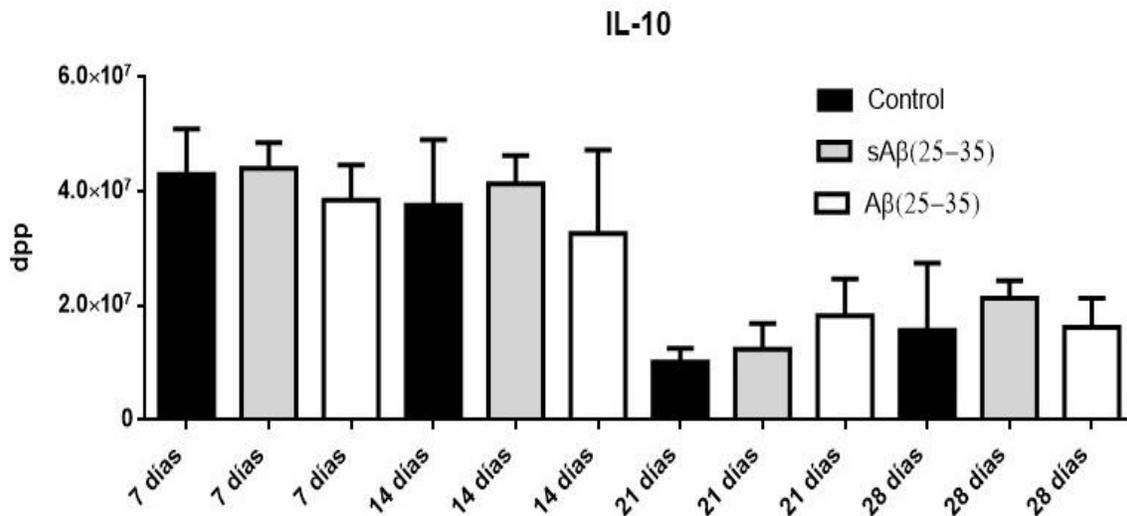


Figura 16 Niveles de IL-10 sérico

No se muestra ninguna diferencia estadísticamente significativa en el suero de las ratas tratadas con Aβ (25-35).



6 DISCUSIÓN

Cuando observamos los cortes histológicos del hipocampo a los 14 días después de la inyección de A β (25-35) claramente se observa una disminución de la celularidad en el área inyectada, lo cual no fue observado en el grupo de ratas control. Esta disminución de la celularidad podría ser un efecto que está asociado a la presencia de A β (1-42) y la actividad del mismo sobre los receptores NMDA de las neuronas, ya que se ha reportado que ésta genera una cascada de citotoxicidad que culmina con la muerte neuronal por disfunción mitocondrial y activación de las caspasas (Chong, Shin, Lee, Kang, & Suh, 2002; Xu, Chen, Ahmed, et al., 2001) además, los cambios histopatológicos observados concuerdan con la alteración de la memoria reportada al día 14 posterior a la administración del A β (25-35) (Limon et al., 2009). En cambio al observar las muestras de tejido de animales con el mismo tratamiento al día 28, observamos aumento en la celularidad del hipocampo, esto asociado a la disminución de los depósitos del A β (25-35); ya que como se ha reportado el daño neurológico está asociado a la presencia de los depósitos del A β (1-42) (Tiraboschi, Hansen, Thal, & Corey-Bloom, 2004). Esta recuperación al día 28 después de la inyección, ha sido descrita para el A β (25-35) ya que posterior a los 40 días no han sido detectados depósitos del mismo (Giovannelli et al., 1995), dicha recuperación ha sido demostrada experimentalmente a través de la evaluación del daño a la memoria en animales inyectados con A β (25-35) y sometidos a prueba de laberinto acuático (Diaz et al., 2010).

Como se ha reportado el A β (25-35) *scrambled* no indujo modificación histológica alguna, ya que dicho A β s (25-35) no posee actividad citotóxica sobre la microglía, las neuronas (Li & Holscher, 2007) y astrocitos (Hu, Akama, Krafft, Chromy, & Van Eldik, 1998; Korotzer, Pike, & Cotman, 1993). Por lo anterior las modificaciones histológicas y de respuesta inmunológica al estrés oxidativo descritas en los resultados pueden ser atribuidas directamente a la secuencia de



los aminoácidos que presenta el A β (25-35), siendo dicha característica la que le proporciona su actividad tóxica y agregante (Sabate et al., 2010).

De esta manera corroboramos que el modelo aplicado en este estudio presenta hallazgos histológicos similares a los reportados en pacientes con la EA, por lo que es útil para la evaluación de la respuesta inmune sistémica.

Por otro lado al evaluar la concentración de nitritos en hipocampo observamos un incremento significativo en la producción de NO a las 1.5 hrs posteriores a la administración de A β (25-35), lo cual es similar a lo reportado en estudios *in vivo* en hipocampo de rata estimulado con A β (25-35) que presentó incremento en la producción del NO posterior a la primer hora de exposición (Rosales-Corral et al., 2004). Esto indica que el efecto del A β (25-35) sobre las células y el daño que produce a través del estrés oxidativo es casi inmediato, por lo que es un indicador claro del daño en la EA. Este aumento en la producción del NO en hipocampo fue detectable hasta el día 28, dicho hallazgo es similar a lo reportado previamente en estudios de A β (25-35) (Limon et al., 2009).

El período de daño producido por el A β (25-35) en este estudio, mediante la evaluación de los niveles de NO en el hipocampo también es comparable con el daño en la memoria descrito en el modelo animal, ya que reportes previos muestran que ratas administradas con A β (25-35) requieren un tiempo mayor para resolver el laberinto acuático desde los primeros días posteriores a la inyección (Diaz, Mendieta, Zenteno, Guevara, & Limon, 2011; Limon et al., 2009). Esta alteración en la memoria permanece hasta los 28 días posteriores al tratamiento, lo que concuerda con la detección del A β (25-35) y los resultados de este estudio en referencia a los niveles de NO en hipocampo. Por lo anterior es posible afirmar que el daño en la memoria guarda estrecha relación con la presencia del A β (25-35) y el estrés oxidativo representado por la producción de NO.

Sin embargo un hallazgo que llama la atención en nuestro estudio es la presencia de niveles de A β (25-35) detectables en el suero de animales tratados a partir del día 14 para posteriormente descender a niveles no detectables. Es bien sabido que los niveles séricos de A β (1-42) se incrementan durante la Fase de Deterioro



Cognitivo Leve (Luis et al., 2009). El cual se acompaña de datos clínicos de pacientes con la EA relacionados a alteraciones en la memoria, hasta el momento no se han reportado datos de incremento en los niveles séricos del A β en modelos animales; nuestros resultados coinciden en tiempo con los publicados sobre la detección de fallo en la memoria (Limon et al., 2011).

El mecanismo por el cual el A β (25-35) pudo haber llegado a circulación sanguínea puede ser explicado por dos vertientes; la primera de ellas sería mediante el drenaje antigénico (Weller et al., 2008) y la segunda por el aumento en la producción del A β por parte de las células endoteliales (Soriano et al., 2003). Ya que se ha descrito que los A β (25-35), (1-40) y (1-42) son capaces de transportarse y depositarse en el espacio perivascular y la barrera hematoencefálica para posteriormente seguir el drenaje del líquido cerebroespinal hasta drenar en los nódulos linfáticos de cuello (Weller et al., 1998), o bien drenar en la placa cribiforme (Weller, Phillips, Kida, & Zhang, 1997), sin presentar ninguna modificación estructural o hidrolizarse (Laman & Weller, 2013) como si se tratara de algún antígeno proteico (Hawkes et al., 2011). También es posible que el drenaje antigénico se diera por la disrupción vascular inducida por las fracciones tóxicas de A β ((25-35), (1-42)) en la barrera hematoencefálica pudiendo drenar directamente al torrente sanguíneo (Hawkes et al., 2012). De esta manera el drenaje antigénico sería la principal explicación plausible para los niveles de A β (25-35) detectados en suero de nuestras ratas.

Existe una segunda vía por la cual los niveles de A β (25-35) en suero se vieron incrementados. Este mecanismo estaría en relación a los depósitos que se han descrito de A β (1-42) tanto en vasculatura de la barrera hematoencefálica (Thal et al., 2007) como de otros vasos como la aorta (Smith, Cappai, & Barnham, 2007). Se ha demostrado que las células endoteliales ante el estímulo del A β (1-42), aumentan la producción del A β (1-40) (Soriano et al., 2003), por lo que no se descarta la posibilidad de que el aumento en los niveles séricos del A β (1-40) que observamos en suero, se haya producido por células endoteliales expuestas al A β (25-35).



Sorprendentemente los niveles de A β (25-35) sérico no se comportaron como los niveles de A β (25-35) detectados en el hipocampo ya que posterior al día 14 los niveles séricos del A β (25-35) descendieron significativamente, mientras que en el hipocampo se detectaron hasta el día 28. Este comportamiento había sido descrito solamente en humanos diagnosticados con la EA, ya que posterior a la etapa del período de DCL se presenta disminución significativa de los niveles de A β (1-42) (Luis et al., 2009), así como disminución de los niveles del mismo en el LCE en relación al progreso de la enfermedad (Song, Poljak, Smythe, & Sachdev, 2009), sin que esto signifique mejora en los síntomas relacionados al deterioro de la memoria.

Los datos obtenidos en este estudio sugieren que el comportamiento del A β (25-35) sérico es similar al A β (1-42) que se observa en humanos con la EA. Aún no se conocen cuáles son los mecanismos que llevan a su disminución en humanos; sin embargo, se ha especulado que está asociada al decremento en la producción del amiloide como resultado de la disminución de la celularidad y por consecuencia de los sitios de producción disponibles (Gotz et al., 2011), o bien por el atrapamiento del A β en las placas neuríticas observadas en los pacientes con la EA (Tiraboschi et al., 2004).

En este estudio, la hipótesis del atrapamiento del A β (1-42) por parte de las placas neuríticas observadas en humanos con la EA no sería aplicable, ya que como se ha comentado tanto en este estudio como en reportes previos, los depósitos de A β (25-35) en rata tienden a desaparecer desde los 28 días a ser casi imperceptibles al día 40 (Giovanelli et al., 2004). Sin embargo, la hipótesis referente a la disminución de la fuente productora de A β (1-42) por disminución de los sitios sinápticos descrita para la EA podría explicar lo observado en nuestro estudio, ya que solo se administró una dosis del A β (25-35) por lo que el suministro del fragmento tóxico se vería limitado al tiempo transcurrido entre la administración y la eliminación del fragmento tóxico del A β (25-35) por parte de la rata. Sin embargo esto no explica el decremento de los niveles séricos del A β (25-35) detectados a partir del día 14; estudios realizados en humanos y en ensayos *in*



vitro, muestran que el A β (1-42) una vez que alcanza el torrente sanguíneo puede ser procesado de dos maneras, la primera, mediante el acoplamiento del A β (1-42) a lipoproteínas de baja densidad para su transporte y posterior procesamiento; del A β (1-42) sérico libre, el 5% se adhiere al lipoproteínas, un 89% de A β (1-42) sérico es transportado por albúmina generando complejos albumina- amiloide (Biere et al., 1996) y el restante 6% se une a diversas moléculas; sin embargo, se desconoce la proporción entre el A β (1-42) libre en suero y aquel que se deposita en las células como las endoteliales, aunque se ha señalado que también puede depositarse en células de los islotes pancreáticos (Rubio et al., 2014), los glóbulos rojos (Nakagawa et al., 2011) y los megacariocitos (Soriano et al., 2003).

Las células endoteliales serían el segundo mecanismo de procesamiento del A β (1-42) sérico, ya que el amiloide tiende a depositarse en los espacios perivasculares como ha sido demostrado (Thal et al., 2007), posteriormente, la célula endotelial tiende a fagocitar al A β (1-42) y depositarlo en el citoplasma, mitocondria y retículo endoplásmico donde tiende a generar depósitos de difícil procesamiento (Fonseca, Oliveira, Pereira, & Cardoso, 2014; D. G. Smith et al., 2007; Xu, Chen, Ku, et al., 2001).

En lo que respecta al NO este es una molécula, disruptora, pro-inflamatoria y metabólica. Los resultados mostraron incremento de NO en el hipocampo después de la 1.5 hrs de haberse estimulado con β A (25-35), el cual se mantuvo por 28 días. Estos resultados coinciden con reportes previos (Rosales-Corral et al., 2004; Stepanichev et al., 2008), este incremento puede asociarse a la respuesta de la microglía (Zielasek et al., 1992).

Con base en los hallazgos de las concentraciones del A β (25-35) en suero y en el hipocampo, se decidió a evaluar si los niveles de NO sérico se comportaban de manera diferente a los niveles presentes en el hipocampo.

Curiosamente los niveles de NO sérico fueron diferentes a los observados en el hipocampo, ya que se observó un incremento significativo en los niveles de NO en suero a partir de las 3 hrs, lo cual representa el doble de tiempo requerido para



producir niveles de NO significativamente altos en el hipocampo; este retraso podría ser originado por el tiempo que se requiere para llevar a cabo el drenaje antigénico en la rata y la reacción por parte de las células endoteliales para producir el NO, sin embargo, no hay estudios hasta el momento que expliquen dichos fenómenos.

El incremento de los niveles de NO en suero solo permaneció hasta el día 14 seguido de niveles similares a las ratas control y a las tratadas con A β s lo cual difiere de lo observado en los niveles de NO en hipocampo.

La presencia de las concentraciones séricas elevadas de NO encontradas hasta el día 14 coinciden con la presencia del A β (25-35) en suero, esto explica por qué la actividad de la eNOS se induce por la presencia del A β (1-42) (Rajadas et al., 2013). A la par de que los niveles del A β (25-35) sérico se vuelven indetectables, encontramos reducción en los niveles del NO sérico, lo que nos permite asociar la reducción de NO sérico a la ausencia del A β (25-35) sérico; comportamiento similar a los descritos en humanos con la EA (Luis et al., 2009; Tohgi et al., 1998). A partir del día 21 las muestras séricas mostraron decremento en las concentraciones de NO, lo cual también es similar a lo ocurrido en pacientes con la EA (Luis et al., 2009). Esto podría deberse a los mecanismos que presenta el A β para inhibir la síntesis del NO, de los cuales se han descrito 3:

- 1) El A β tiene la propiedad de inhibir la actividad de las eNOS por acomplamiento del A β a dicha enzima (Venturini et al., 2002).
- 2) Como se ha descrito el A β tiende a unirse a diferentes moléculas; una de ellas es la NADPH que al unirse al amiloide pierde su capacidad catalítica e inhibe la síntesis del NO (Verri et al., 2012) (**Figura 17**).
- 3) La reducción de los niveles de arginina, pueden afectar la síntesis del NO; ya que este aminoácido es el sustrato de la generación del NO. Cambios en la concentración de arginina, después de haber presentado



incremento en la concentración de arginina durante la etapa del DCL, han sido descritos en pacientes con la EA (Ravaglia et al., 2004).

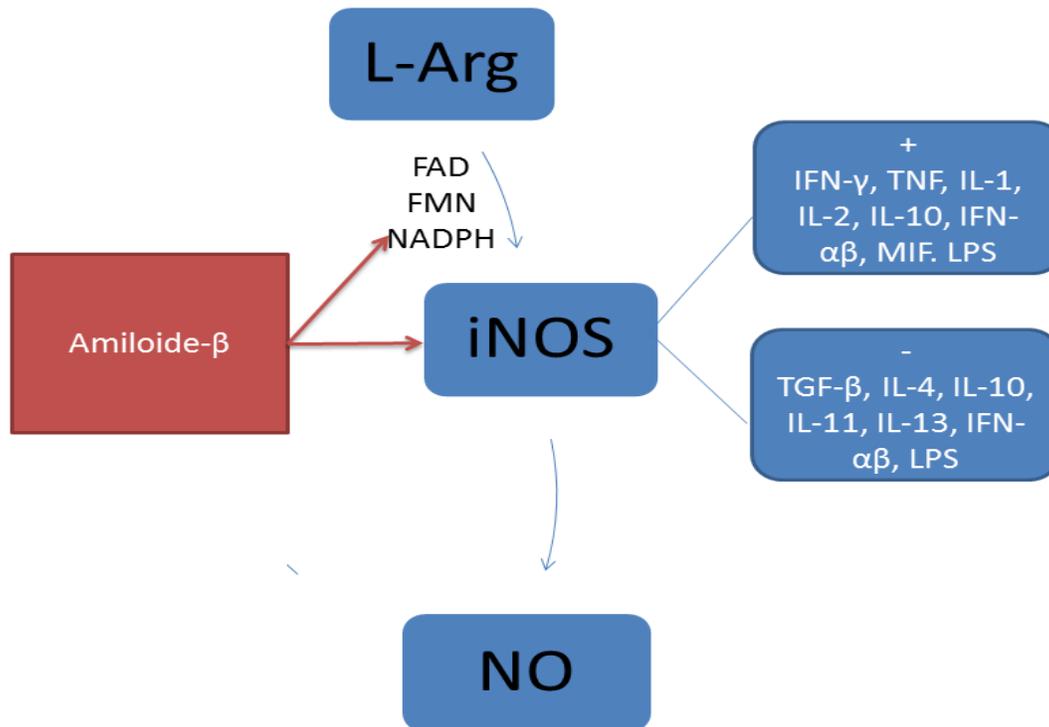


Figura 17 Posibles vías afectadas en la síntesis del Óxido Nítrico por Amiloide-β

Ningún subgrupo tratado con Aβs mostró incremento de los niveles de NO en el hipocampo o en el suero en comparación al grupo control. Nuestros resultados confirman que la toxicidad del amiloide está basada en la secuencia del péptido y no en sus estados de agregación (Korotzer et al., 1993).

Similar al observado con las concentraciones de NO sérico y Aβ (25-35) encontramos incremento de IFN-γ, a partir del séptimo día y hasta el día 14, esto coincide con los tiempos en los que hay niveles detectables del Aβ (1-42) en suero. Por lo anterior podemos asociar el incremento en la producción del IFN-γ a los efectos del Aβ (1-42) sobre células como: astrogliá, microglía, (Rubio-Perez & Morillas-Ruiz, 2012), linfocitos Th1 (Browne et al., 2013) y células endoteliales



(Vukic et al., 2009), a lo observado en pacientes con EA, en los que los niveles de β A (1-42) disminuyen junto con los de IFN- γ (Luis et al., 2009; Rota et al., 2006). Respecto a los niveles incrementados de TNF- α e IL-6 en el día 21 y 28, estos pueden asociarse a la activación que ejerce el A β (1-42) sobre diversas células como macrófagos, microglía, linfocitos Th1, células endoteliales entre otras (Fiala et al., 1998; Klegeris, Walker, & McGeer, 1994), generando un microambiente pro-inflamatorio a nivel sistémico, el cual es característico de la EA (Morales et al., 2014; Swardfager et al., 2010). Por lo anterior podemos asociar los efectos inmunológicos conocidos del A β (1-42) a los resultados obtenidos en este estudio, ya sea por su presencia en suero (como lo observamos en este estudio) o a los depósitos en cerebro y perivasculares observados tanto en el modelo de rata como en pacientes con la EA (D. P. Smith et al., 2007; Thomas et al., 1996).

En lo que se refiere a los niveles séricos de IL-10 (Sabat et al., 2010) no encontramos diferencia alguna entre los tres grupos, lo que coincide con reportes de pacientes con la EA y en DCL (Swardfager et al., 2010). Esto podría interpretarse como la ausencia de respuesta anti-inflamatoria sistémica parcial. Dado que al evaluar la respuesta al A β (1-42) por parte de células mononucleares extraídas de sangre de pacientes con EA, se ha observado que las células son incapaces de producir IL-10 (Asselineau et al., 2015).

En contraste, al evaluar las concentraciones séricas de IL-17 observamos un comportamiento completamente distinto al anterior; ya que al día 7 observamos una ligera expresión de IL-17 en el grupo A β s y en el grupo control, mientras que en el grupo administrado con A β (25-35) no se observó la expresión de IL-17 hasta el día 14. Esto puede explicarse por la baja diferenciación de linfocitos Th17 a expensas de altas concentraciones de IFN- γ que es un supresor de dicha diferenciación (Aravena et al., 2011); en estudios realizados en el hipocampo de rata administrada con A β (25-35) para determinar la presencia de linfocitos Th17, se observó la presencia de dichos linfocitos hasta el día 14 posterior a la inyección



(Zhang, Ke, Liu, Qiu, & Peng, 2013). Por otro lado, es hasta el día 21 que se observa incremento significativo en la producción de IL-17 que está en relación con la disminución de IFN- γ y el aumento en la producción de IL-6, el cual sirve de estimulante para la diferenciación de linfocitos Th-17 (Shabgah, Fattahi, & Shahneh, 2014).

El incremento en la concentración de IL-17 es observado en los pacientes con la EA pero no en individuos con DCL (Swardfager et al., 2010), por lo que el comportamiento observado en este estudio es similar al comportamiento que presentan los pacientes con la EA. Por lo anterior pensamos que el A β (25-35) ó (1-42) tienen un papel preponderante en la inhibición de la respuesta anti-inflamatoria.



7 CONCLUSIÓN

Las variaciones que encontramos en relación a los nitritos y la concentración de citocinas en suero tiene dos fases, la primera se caracterizara por un ambiente pro-inflamatorio y la segunda fase por la ausencia de los niveles de β A (25-35) en el suero y la respuesta anti-inflamatoria. Esto podría explicar los cambios observados en el suero en pacientes con DCL y la EA. Dado que los resultados obtenidos en este estudio reproducen algunas de las características observadas en humanos, nuestros resultados sugieren que la administración de β A (25-35) en el hipocampo de rata podría ser usado como un modelo para evaluar la respuesta inmune sistémica y el óxido nítrico que es un indicador de estrés oxidativo.



8 BIBLIOGRAFÍA

- Akiyama, H., Arai, T., Kondo, H., Tanno, E., Haga, C., & Ikeda, K. (2000). Cell mediators of inflammation in the Alzheimer disease brain. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, *14 Suppl 1*, S47-53.
- Aravena, O., Pesce, B., Soto, L., Orrego, N., Sabugo, F., Wurmman, P., . . . Catalan, D. (2011). Anti-TNF therapy in patients with rheumatoid arthritis decreases Th1 and Th17 cell populations and expands IFN-gamma-producing NK cell and regulatory T cell subsets. *Immunobiology*, *216*(12), 1256-1263. doi: 10.1016/j.imbio.2011.07.006
- Asselineau, D., Benhassan, K., Arosio, B., Mari, D., Ferri, E., Casati, M., . . . Bray, D. H. (2015). Interleukin-10 Production in Response to Amyloid-beta Differs between Slow and Fast Decliners in Patients with Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, *46*(4), 837-842. doi: 10.3233/JAD-142832
- Atwood, C. S., Obrenovich, M. E., Liu, T., Chan, H., Perry, G., Smith, M. A., & Martins, R. N. (2003). Amyloid-beta: a chameleon walking in two worlds: a review of the trophic and toxic properties of amyloid-beta. *Brain Res Brain Res Rev*, *43*(1), 1-16.
- Austin, S. A., Santhanam, A. V., & Katusic, Z. S. (2010). Endothelial nitric oxide modulates expression and processing of amyloid precursor protein. *Circ Res*, *107*(12), 1498-1502. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233080
- Baranano, D. E., & Snyder, S. H. (2001). Neural roles for heme oxygenase: contrasts to nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *98*(20), 10996-11002. doi: 10.1073/pnas.191351298
- Biere, A. L., Ostaszewski, B., Stimson, E. R., Hyman, B. T., Maggio, J. E., & Selkoe, D. J. (1996). Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. *J Biol Chem*, *271*(51), 32916-32922.
- Broussard, G. J., Mytar, J., Li, R. C., & Klapstein, G. J. (2012). The role of inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Inflammopharmacology*, *20*(3), 109-126. doi: 10.1007/s10787-012-0130-z
- Browne, T. C., McQuillan, K., McManus, R. M., O'Reilly, J. A., Mills, K. H., & Lynch, M. A. (2013). IFN-gamma Production by amyloid beta-specific Th1 cells promotes microglial activation and increases plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Immunol*, *190*(5), 2241-2251. doi: 10.4049/jimmunol.1200947
- Butterfield, D. A. (2003). Amyloid beta-peptide [1-42]-associated free radical-induced oxidative stress and neurodegeneration in Alzheimer's disease brain: mechanisms and consequences. *Curr Med Chem*, *10*(24), 2651-2659.
- Butterfield, D. A., Swomley, A. M., & Sultana, R. (2013). Amyloid beta-peptide (1-42)-induced oxidative stress in Alzheimer disease: importance in disease pathogenesis and progression. *Antioxid Redox Signal*, *19*(8), 823-835. doi: 10.1089/ars.2012.5027
- Cai, H., Wang, Y., McCarthy, D., Wen, H., Borchelt, D. R., Price, D. L., & Wong, P. C. (2001). BACE1 is the major beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci*, *4*(3), 233-234. doi: 10.1038/85064
- Cappai, R. (2014). Making sense of the amyloid precursor protein: its tail tells an interesting tale. *J Neurochem*, *130*(3), 325-327. doi: 10.1111/jnc.12707



- Cole, G., Masliah, E., Huynh, T. V., DeTeresa, R., Terry, R. D., Okuda, C., & Saitoh, T. (1989). An antiserum against amyloid beta-protein precursor detects a unique peptide in Alzheimer brain. *Neurosci Lett*, *100*(1-3), 340-346.
- Coria, F., & Rubio, I. (1996). Cerebral amyloid angiopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, *22*(3), 216-227.
- Cho, D. H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., & Lipton, S. A. (2009). S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science*, *324*(5923), 102-105. doi: 10.1126/science.1171091
- Chong, Y. H., Shin, S. A., Lee, H. J., Kang, J. H., & Suh, Y. H. (2002). Molecular mechanisms underlying cyclic AMP inhibition of macrophage dependent TNF-alpha production and neurotoxicity in response to amyloidogenic C-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein. *J Neuroimmunol*, *133*(1-2), 160-174.
- Dalgediene, I., Lasickiene, R., Budvytyte, R., Valincius, G., Morkuniene, R., Borutaite, V., & Zvirbliene, A. (2013). Immunogenic properties of amyloid beta oligomers. *J Biomed Sci*, *20*, 10. doi: 10.1186/1423-0127-20-10
- de la Torre, J. C., & Stefano, G. B. (2000). Evidence that Alzheimer's disease is a microvascular disorder: the role of constitutive nitric oxide. *Brain Res Brain Res Rev*, *34*(3), 119-136.
- Deys, C., Thinakaran, G., & Parent, A. T. (2016). APP Receptor? To Be or Not To Be. *Trends Pharmacol Sci*. doi: 10.1016/j.tips.2016.01.005
- Diaz, A., De Jesus, L., Mendieta, L., Calvillo, M., Espinosa, B., Zenteno, E., . . . Limon, I. D. (2010). The amyloid-beta₂₅₋₃₅ injection into the CA1 region of the neonatal rat hippocampus impairs the long-term memory because of an increase of nitric oxide. *Neurosci Lett*, *468*(2), 151-155. doi: 10.1016/j.neulet.2009.10.087
- Diaz, A., Mendieta, L., Zenteno, E., Guevara, J., & Limon, I. D. (2011). The role of NOS in the impairment of spatial memory and damaged neurons in rats injected with amyloid beta 25-35 into the temporal cortex. *Pharmacol Biochem Behav*, *98*(1), 67-75. doi: 10.1016/j.pbb.2010.12.005
- Drake, J., Link, C. D., & Butterfield, D. A. (2003). Oxidative stress precedes fibrillar deposition of Alzheimer's disease amyloid beta-peptide (1-42) in a transgenic *Caenorhabditis elegans* model. *Neurobiol Aging*, *24*(3), 415-420.
- Fiala, M., Zhang, L., Gan, X., Sherry, B., Taub, D., Graves, M. C., . . . Roher, A. E. (1998). Amyloid-beta induces chemokine secretion and monocyte migration across a human blood--brain barrier model. *Mol Med*, *4*(7), 480-489.
- Fonseca, A. C., Oliveira, C. R., Pereira, C. F., & Cardoso, S. M. (2014). Loss of proteostasis induced by amyloid beta peptide in brain endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*, *1843*(6), 1150-1161. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.02.016
- Ford, A. F., & Shorter, J. (2015). Fleeting Amyloid-like Forms of Rim4 Ensure Meiotic Fidelity. *Cell*, *163*(2), 275-276. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.049
- Forloni, G., Chiesa, R., Smirardo, S., Verga, L., Salmona, M., Tagliavini, F., & Angeretti, N. (1993). Apoptosis mediated neurotoxicity induced by chronic application of beta amyloid fragment 25-35. *Neuroreport*, *4*(5), 523-526.
- Funk, O. H., & Kwan, K. Y. (2014). Nitric oxide signaling in the development and evolution of language and cognitive circuits. *Neurosci Res*. doi: 10.1016/j.neures.2014.06.001
- Giovanelli, D., Buzzeo, M. C., Lawrence, N. S., Hardacre, C., Seddon, K. R., & Compton, R. G. (2004). Determination of ammonia based on the electro-oxidation of hydroquinone in dimethylformamide or in the room temperature ionic liquid, 1-ethyl-3-methylimidazolium



- bis(trifluoromethylsulfonyl)imide. *Talanta*, 62(5), 904-911. doi: 10.1016/j.talanta.2003.10.015
- Giovannelli, L., Casamenti, F., Scali, C., Bartolini, L., & Pepeu, G. (1995). Differential effects of amyloid peptides beta-(1-40) and beta-(25-35) injections into the rat nucleus basalis. *Neuroscience*, 66(4), 781-792.
- Gotz, J., Eckert, A., Matamales, M., Ittner, L. M., & Liu, X. (2011). Modes of Aβ toxicity in Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*, 68(20), 3359-3375. doi: 10.1007/s00018-011-0750-2
- Grammas, P., Botchlet, T., Fugate, R., Ball, M. J., & Roher, A. E. (1995). Alzheimer disease amyloid proteins inhibit brain endothelial cell proliferation in vitro. *Dementia (London)*, 6(3), 126-130.
- Griffin, W. S. (2013). Neuroinflammatory cytokine signaling and Alzheimer's disease. *N Engl J Med*, 368(8), 770-771. doi: 10.1056/NEJMcibr1214546
- Guo, L. L., Guan, Z. Z., Huang, Y., Wang, Y. L., & Shi, J. S. (2013). The neurotoxicity of beta-amyloid peptide toward rat brain is associated with enhanced oxidative stress, inflammation and apoptosis, all of which can be attenuated by scutellarin. *Exp Toxicol Pathol*, 65(5), 579-584. doi: 10.1016/j.etp.2012.05.003
- Gutierrez-Robledo, L. M., & Arrieta-Cruz, I. (2015). [Dementia in Mexico: The need for a National Alzheimer's Plan]. *Gac Med Mex*, 151(5), 667-673.
- Harrington, C. R. (2012). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am*, 22(1), 11-22, vii. doi: 10.1016/j.nic.2011.11.003
- Hawkes, C. A., Hartig, W., Kacza, J., Schliebs, R., Weller, R. O., Nicoll, J. A., & Carare, R. O. (2011). Perivascular drainage of solutes is impaired in the ageing mouse brain and in the presence of cerebral amyloid angiopathy. *Acta Neuropathol*, 121(4), 431-443. doi: 10.1007/s00401-011-0801-7
- Hawkes, C. A., Sullivan, P. M., Hands, S., Weller, R. O., Nicoll, J. A., & Carare, R. O. (2012). Disruption of arterial perivascular drainage of amyloid-beta from the brains of mice expressing the human APOE epsilon4 allele. *PLoS One*, 7(7), e41636. doi: 10.1371/journal.pone.0041636
- Hawkins, P. N., Rossor, M. N., Gallimore, J. R., Miller, B., Moore, E. G., & Pepys, M. B. (1994). Concentration of serum amyloid P component in the CSF as a possible marker of cerebral amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 201(2), 722-726. doi: 10.1006/bbrc.1994.1760
- Howlett, D. R., Simmons, D. L., Dingwall, C., & Christie, G. (2000). In search of an enzyme: the beta-secretase of Alzheimer's disease is an aspartic proteinase. *Trends Neurosci*, 23(11), 565-570.
- Hu, J., Akama, K. T., Krafft, G. A., Chromy, B. A., & Van Eldik, L. J. (1998). Amyloid-beta peptide activates cultured astrocytes: morphological alterations, cytokine induction and nitric oxide release. *Brain Res*, 785(2), 195-206.
- Inestrosa, N., De Ferrari, G. V., Garrido, J. L., Alvarez, A., Olivares, G. H., Barria, M. I., . . . Chacon, M. A. (2002). Wnt signaling involvement in beta-amyloid-dependent neurodegeneration. *Neurochem Int*, 41(5), 341-344.
- Irizarry, M. C. (2004). Biomarkers of Alzheimer disease in plasma. *NeuroRx*, 1(2), 226-234. doi: 10.1602/neurorx.1.2.226
- Itagaki, S., McGeer, P. L., Akiyama, H., Zhu, S., & Selkoe, D. (1989). Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol*, 24(3), 173-182.



- Kalaria, R. N., Cohen, D. L., Greenberg, B. D., Savage, M. J., Bogdanovic, N. E., Winblad, B., . . . Adem, A. (1996). Abundance of the longer A beta 42 in neocortical and cerebrovascular amyloid beta deposits in Swedish familial Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Neuroreport*, 7(8), 1377-1381.
- Kasai, T., Tokuda, T., Taylor, M., Kondo, M., Mann, D. M., Foulds, P. G., . . . Allsop, D. (2013). Correlation of Abeta oligomer levels in matched cerebrospinal fluid and serum samples. *Neurosci Lett*, 551, 17-22. doi: 10.1016/j.neulet.2013.06.029
- Kelley, B. J., & Petersen, R. C. (2007). Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Neurol Clin*, 25(3), 577-609, v. doi: 10.1016/j.ncl.2007.03.008
- Klegeris, A., Walker, D. G., & McGeer, P. L. (1994). Activation of macrophages by Alzheimer beta amyloid peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 199(2), 984-991. doi: 10.1006/bbrc.1994.1326
- Korolainen, M. A., & Pirttila, T. (2009). Cerebrospinal fluid, serum and plasma protein oxidation in Alzheimer's disease. *Acta Neurol Scand*, 119(1), 32-38. doi: 10.1111/j.1600-0404.2008.01057.x
- Korotzer, A. R., Pike, C. J., & Cotman, C. W. (1993). beta-Amyloid peptides induce degeneration of cultured rat microglia. *Brain Res*, 624(1-2), 121-125.
- Laman, J. D., & Weller, R. O. (2013). Drainage of cells and soluble antigen from the CNS to regional lymph nodes. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8(4), 840-856. doi: 10.1007/s11481-013-9470-8
- Lan, A., Liao, X., Mo, L., Yang, C., Yang, Z., Wang, X., . . . Xiao, L. (2011). Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced injury by inhibiting ROS-activated ERK1/2 and p38MAPK signaling pathways in PC12 cells. *PLoS One*, 6(10), e25921. doi: 10.1371/journal.pone.0025921
- Lazarczyk, M. J., Hof, P. R., Bouras, C., & Giannakopoulos, P. (2012). Preclinical Alzheimer disease: identification of cases at risk among cognitively intact older individuals. *BMC Med*, 10, 127. doi: 10.1186/1741-7015-10-127
- Ledo, J. H., Azevedo, E. P., Clarke, J. R., Ribeiro, F. C., Figueiredo, C. P., Foguel, D., . . . Ferreira, S. T. (2013). Amyloid-beta oligomers link depressive-like behavior and cognitive deficits in mice. *Mol Psychiatry*, 18(10), 1053-1054. doi: 10.1038/mp.2012.168
- Li, L., & Holscher, C. (2007). Common pathological processes in Alzheimer disease and type 2 diabetes: a review. *Brain Res Rev*, 56(2), 384-402. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.09.001
- Liao, L. D., Bandla, A., Ling, J. M., Liu, Y. H., Kuo, L. W., Chen, Y. Y., . . . Thakor, N. V. (2014). Improving neurovascular outcomes with bilateral forepaw stimulation in a rat photothrombotic ischemic stroke model. *Neurophotonics*, 1(1), 011007. doi: 10.1117/1.NPh.1.1.011007
- Limon, I. D., Diaz, A., Mendieta, L., Chamorro, G., Espinosa, B., Zenteno, E., & Guevara, J. (2009). Amyloid-beta(25-35) impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats. *Neurosci Res*, 63(2), 129-137. doi: 10.1016/j.neures.2008.11.006
- Limon, I. D., Ramirez, E., Diaz, A., Mendieta, L., Mayoral, M. A., Espinosa, B., . . . Zenteno, E. (2011). Alteration of the sialylation pattern and memory deficits by injection of Abeta(25-35) into the hippocampus of rats. *Neurosci Lett*, 495(1), 11-16. doi: 10.1016/j.neulet.2011.03.006
- Liu, Q., Zhang, J., Tran, H., Verbeek, M. M., Reiss, K., Estus, S., & Bu, G. (2009). LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17. *Mol Neurodegener*, 4, 17. doi: 10.1186/1750-1326-4-17



- Luis, C. A., Abdullah, L., Paris, D., Quadros, A., Mullan, M., Mouzon, B., . . . Mullan, M. (2009). Serum beta-amyloid correlates with neuropsychological impairment. *Neuropsychol Dev Cogn B Aging Neuropsychol Cogn*, *16*(2), 203-218. doi: 10.1080/13825580802411766
- Luth, H. J., Holzer, M., Gartner, U., Staufenbiel, M., & Arendt, T. (2001). Expression of endothelial and inducible NOS-isoforms is increased in Alzheimer's disease, in APP23 transgenic mice and after experimental brain lesion in rat: evidence for an induction by amyloid pathology. *Brain Res*, *913*(1), 57-67.
- Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, *430*(7000), 631-639. doi: 10.1038/nature02621
- McGeer, P. L., & McGeer, E. G. (2001). Inflammation, autotoxicity and Alzheimer disease. *Neurobiol Aging*, *22*(6), 799-809.
- McKhann, G. M., Knopman, D. S., Chertkow, H., Hyman, B. T., Jack, C. R., Jr., Kawas, C. H., . . . Phelps, C. H. (2011). The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, *7*(3), 263-269. doi: 10.1016/j.jalz.2011.03.005
- Menting, K. W., & Claassen, J. A. (2014). beta-secretase inhibitor; a promising novel therapeutic drug in Alzheimer's disease. *Front Aging Neurosci*, *6*, 165. doi: 10.3389/fnagi.2014.00165
- Mohamed, T., Shakeri, A., & Rao, P. P. (2016). Amyloid cascade in Alzheimer's disease: Recent advances in medicinal chemistry. *Eur J Med Chem*, *113*, 258-272. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.02.049
- Morales, I., Guzman-Martinez, L., Cerda-Troncoso, C., Farias, G. A., & Maccioni, R. B. (2014). Neuroinflammation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. A rational framework for the search of novel therapeutic approaches. *Front Cell Neurosci*, *8*, 112. doi: 10.3389/fncel.2014.00112
- Nakagawa, K., Kiko, T., Kuriwada, S., Miyazawa, T., Kimura, F., & Miyazawa, T. (2011). Amyloid beta induces adhesion of erythrocytes to endothelial cells and affects endothelial viability and functionality. *Biosci Biotechnol Biochem*, *75*(10), 2030-2033. doi: 10.1271/bbb.110318
- Naslund, J., Schierhorn, A., Hellman, U., Lannfelt, L., Roses, A. D., Tjernberg, L. O., . . . et al. (1994). Relative abundance of Alzheimer A beta amyloid peptide variants in Alzheimer disease and normal aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(18), 8378-8382.
- Nhan, H. S., Chiang, K., & Koo, E. H. (2015). The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol*, *129*(1), 1-19. doi: 10.1007/s00401-014-1347-2
- Okabe, Y., Takahashi, T., Mitsumasu, C., Kosai, K., Tanaka, E., & Matsuishi, T. (2012). Alterations of gene expression and glutamate clearance in astrocytes derived from an MeCP2-null mouse model of Rett syndrome. *PLoS One*, *7*(4), e35354. doi: 10.1371/journal.pone.0035354
- Paxinos, G., & Watson, C. (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates* (4th ed.). San Diego: Academic Press.
- Payami, H., Nutt, J., Ganchar, S., Bird, T., McNeal, M. G., Seltzer, W. K., . . . Farrer, M. (2003). SCA2 may present as levodopa-responsive parkinsonism. *Mov Disord*, *18*(4), 425-429. doi: 10.1002/mds.10375
- Petersen, R. C., Roberts, R. O., Knopman, D. S., Boeve, B. F., Geda, Y. E., Ivnik, R. J., . . . Jack, C. R., Jr. (2009). Mild cognitive impairment: ten years later. *Arch Neurol*, *66*(12), 1447-1455. doi: 10.1001/archneurol.2009.266



- Pratico, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanowski, J. Q., & Lee, V. M. (2001). Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci*, *21*(12), 4183-4187.
- Prince, M., Bryce, R., Albanese, E., Wimo, A., Ribeiro, W., & Ferri, C. P. (2013). The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimers Dement*, *9*(1), 63-75 e62. doi: 10.1016/j.jalz.2012.11.007
- Rajadas, J., Sun, W., Li, H., Inayathullah, M., Cereghetti, D., Tan, A., . . . Rifkind, J. M. (2013). Enhanced Aβ(1-40) production in endothelial cells stimulated with fibrillar Aβ(1-42). *PLoS One*, *8*(3), e58194. doi: 10.1371/journal.pone.0058194
- Ravaglia, G., Forti, P., Maioli, F., Bianchi, G., Martelli, M., Talerico, T., . . . Mariani, E. (2004). Plasma amino acid concentrations in patients with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *Am J Clin Nutr*, *80*(2), 483-488.
- Rosales-Corral, S., Tan, D. X., Reiter, R. J., Valdivia-Velazquez, M., Acosta-Martinez, J. P., & Ortiz, G. G. (2004). Kinetics of the neuroinflammation-oxidative stress correlation in rat brain following the injection of fibrillar amyloid-beta onto the hippocampus in vivo. *J Neuroimmunol*, *150*(1-2), 20-28. doi: 10.1016/j.jneuroim.2004.01.005
- Rota, E., Bellone, G., Rocca, P., Bergamasco, B., Emanuelli, G., & Ferrero, P. (2006). Increased intrathecal TGF-β1, but not IL-12, IFN-γ and IL-10 levels in Alzheimer's disease patients. *Neurol Sci*, *27*(1), 33-39. doi: 10.1007/s10072-006-0562-6
- Rubio-Perez, J. M., & Morillas-Ruiz, J. M. (2012). A review: inflammatory process in Alzheimer's disease, role of cytokines. *ScientificWorldJournal*, *2012*, 756357. doi: 10.1100/2012/756357
- Rubio, M. E., Fukazawa, Y., Kamasawa, N., Clarkson, C., Molnar, E., & Shigemoto, R. (2014). Target- and input-dependent organization of AMPA and NMDA receptors in synaptic connections of the cochlear nucleus. *J Comp Neurol*, *522*(18), 4023-4042. doi: 10.1002/cne.23654
- Sabat, R., Grutz, G., Warszawska, K., Kirsch, S., Witte, E., Wolk, K., & Geginat, J. (2010). Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev*, *21*(5), 331-344. doi: 10.1016/j.cytogfr.2010.09.002
- Sabate, R., Espargaro, A., de Groot, N. S., Valle-Delgado, J. J., Fernandez-Busquets, X., & Ventura, S. (2010). The role of protein sequence and amino acid composition in amyloid formation: scrambling and backward reading of IAPP amyloid fibrils. *J Mol Biol*, *404*(2), 337-352. doi: 10.1016/j.jmb.2010.09.052
- Sambamurti, K., Greig, N. H., & Lahiri, D. K. (2002). Advances in the cellular and molecular biology of the beta-amyloid protein in Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, *1*(1), 1-31. doi: 10.1385/NMM:1:1:1
- Schmechel, D. E., Goldgaber, D., Burkhart, D. S., Gilbert, J. R., Gajdusek, D. C., & Roses, A. D. (1988). Cellular localization of messenger RNA encoding amyloid-beta-protein in normal tissue and in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, *2*(2), 96-111.
- Selkoe, D. J. (1993). Physiological production of the beta-amyloid protein and the mechanism of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, *16*(10), 403-409.
- Selkoe, D. J. (1996). Amyloid beta-protein and the genetics of Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, *271*(31), 18295-18298.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev*, *81*(2), 741-766.
- Shabgah, A. G., Fattahi, E., & Shahneh, F. Z. (2014). Interleukin-17 in human inflammatory diseases. *Postepy Dermatol Alergol*, *31*(4), 256-261. doi: 10.5114/pdia.2014.40954



- Simonian, N. A., & Coyle, J. T. (1996). Oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36, 83-106. doi: 10.1146/annurev.pa.36.040196.000503
- Smith, D. G., Cappai, R., & Barnham, K. J. (2007). The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Biochim Biophys Acta*, 1768(8), 1976-1990. doi: 10.1016/j.bbamem.2007.02.002
- Smith, D. P., Ciccotosto, G. D., Tew, D. J., Fodero-Tavoletti, M. T., Johanssen, T., Masters, C. L., . . . Cappai, R. (2007). Concentration dependent Cu²⁺ induced aggregation and dityrosine formation of the Alzheimer's disease amyloid-beta peptide. *Biochemistry*, 46(10), 2881-2891. doi: 10.1021/bi0620961
- Solerte, S. B., Cravello, L., Ferrari, E., & Fioravanti, M. (2000). Overproduction of IFN-gamma and TNF-alpha from natural killer (NK) cells is associated with abnormal NK reactivity and cognitive derangement in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, 917, 331-340.
- Song, F., Poljak, A., Smythe, G. A., & Sachdev, P. (2009). Plasma biomarkers for mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Brain Res Rev*, 61(2), 69-80. doi: 10.1016/j.brainresrev.2009.05.003
- Soriano, F. X., Galbete, J. L., & Forloni, G. (2003). Effect of beta-amyloid on endothelial cells: lack of direct toxicity, enhancement of MTT-induced cell death and intracellular accumulation. *Neurochem Int*, 43(3), 251-261.
- Stepanichev, M. Y., Onufriev, M. V., Yakovlev, A. A., Khrenov, A. I., Peregud, D. I., Vorontsova, O. N., . . . Gulyaeva, N. V. (2008). Amyloid-beta (25-35) increases activity of neuronal NO-synthase in rat brain. *Neurochem Int*, 52(6), 1114-1124. doi: 10.1016/j.neuint.2007.11.009
- Suh, Y. H., & Checler, F. (2002). Amyloid precursor protein, presenilins, and alpha-synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev*, 54(3), 469-525.
- Suo, Z., Tan, J., Placzek, A., Crawford, F., Fang, C., & Mullan, M. (1998). Alzheimer's beta-amyloid peptides induce inflammatory cascade in human vascular cells: the roles of cytokines and CD40. *Brain Res*, 807(1-2), 110-117.
- Swardfager, W., Lanctot, K., Rothenburg, L., Wong, A., Cappell, J., & Herrmann, N. (2010). A meta-analysis of cytokines in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*, 68(10), 930-941. doi: 10.1016/j.biopsych.2010.06.012
- Szczepanik, A. M., Funes, S., Petko, W., & Ringheim, G. E. (2001). IL-4, IL-10 and IL-13 modulate A beta(1-42)-induced cytokine and chemokine production in primary murine microglia and a human monocyte cell line. *J Neuroimmunol*, 113(1), 49-62.
- Szczepanik, A. M., Rampe, D., & Ringheim, G. E. (2001). Amyloid-beta peptide fragments p3 and p4 induce pro-inflammatory cytokine and chemokine production in vitro and in vivo. *J Neurochem*, 77(1), 304-317.
- Tamagno, E., Guglielmotto, M., Aragno, M., Borghi, R., Autelli, R., Giliberto, L., . . . Tabaton, M. (2008). Oxidative stress activates a positive feedback between the gamma- and beta-secretase cleavages of the beta-amyloid precursor protein. *J Neurochem*, 104(3), 683-695. doi: 10.1111/j.1471-4159.2007.05072.x
- Tanaka, S., Shiojiri, S., Takahashi, Y., Kitaguchi, N., Ito, H., Kameyama, M., . . . Ueda, K. (1989). Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor-harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 165(3), 1406-1414.



- Tatarnikova, O. G., Orlov, M. A., & Bobkova, N. V. (2015). Beta-Amyloid and Tau-Protein: Structure, Interaction, and Prion-Like Properties. *Biochemistry (Mosc)*, *80*(13), 1800-1819. doi: 10.1134/S000629791513012X
- Thal, D. R., Larionov, S., Abramowski, D., Wiederhold, K. H., Van Dooren, T., Yamaguchi, H., . . . Capetillo-Zarate, E. (2007). Occurrence and co-localization of amyloid beta-protein and apolipoprotein E in perivascular drainage channels of wild-type and APP-transgenic mice. *Neurobiol Aging*, *28*(8), 1221-1230. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.029
- Thinakaran, G., & Koo, E. H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*, *283*(44), 29615-29619. doi: 10.1074/jbc.R800019200
- Thomas, T., Sutton, E. T., Hellermann, A., & Price, J. M. (1997). Beta-amyloid-induced coronary artery vasoactivity and endothelial damage. *J Cardiovasc Pharmacol*, *30*(4), 517-522.
- Thomas, T., Thomas, G., McLendon, C., Sutton, T., & Mullan, M. (1996). beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. *Nature*, *380*(6570), 168-171. doi: 10.1038/380168a0
- Tiraboschi, P., Hansen, L. A., Thal, L. J., & Corey-Bloom, J. (2004). The importance of neuritic plaques and tangles to the development and evolution of AD. *Neurology*, *62*(11), 1984-1989.
- Tohgi, H., Abe, T., Yamazaki, K., Murata, T., Isobe, C., & Ishizaki, E. (1998). The cerebrospinal fluid oxidized NO metabolites, nitrite and nitrate, in Alzheimer's disease and vascular dementia of Binswanger type and multiple small infarct type. *J Neural Transm (Vienna)*, *105*(10-12), 1283-1291.
- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., & Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol*, *70*(1), 1-32.
- Venturini, G., Colasanti, M., Persichini, T., Fioravanti, E., Ascenzi, P., Palomba, L., . . . Musci, G. (2002). Beta-amyloid inhibits NOS activity by subtracting NADPH availability. *FASEB J*, *16*(14), 1970-1972. doi: 10.1096/fj.02-0186fje
- Verri, M., Pastoris, O., Dossena, M., Aquilani, R., Guerriero, F., Cuzzoni, G., . . . Bongiorno, A. I. (2012). Mitochondrial alterations, oxidative stress and neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Int J Immunopathol Pharmacol*, *25*(2), 345-353.
- Viswanathan, A., Greenberg, S. M., & Scheltens, P. (2016). Role of Vascular Disease in Alzheimer-Like Progressive Cognitive Impairment. *Stroke*, *47*(2), 577-580. doi: 10.1161/STROKEAHA.115.009010
- Vukic, V., Callaghan, D., Walker, D., Lue, L. F., Liu, Q. Y., Couraud, P. O., . . . Zhang, W. (2009). Expression of inflammatory genes induced by beta-amyloid peptides in human brain endothelial cells and in Alzheimer's brain is mediated by the JNK-AP1 signaling pathway. *Neurobiol Dis*, *34*(1), 95-106. doi: 10.1016/j.nbd.2008.12.007
- Weksler, M. E., Relkin, N., Turkenich, R., LaRusse, S., Zhou, L., & Szabo, P. (2002). Patients with Alzheimer disease have lower levels of serum anti-amyloid peptide antibodies than healthy elderly individuals. *Exp Gerontol*, *37*(7), 943-948.
- Weller, R. O., Djuanda, E., Yow, H. Y., & Carare, R. O. (2009). Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol*, *117*(1), 1-14. doi: 10.1007/s00401-008-0457-0
- Weller, R. O., Massey, A., Kuo, Y. M., & Roher, A. E. (2000). Cerebral amyloid angiopathy: accumulation of A beta in interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*, *903*, 110-117.



- Weller, R. O., Massey, A., Newman, T. A., Hutchings, M., Kuo, Y. M., & Roher, A. E. (1998). Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*, *153*(3), 725-733.
- Weller, R. O., Phillips, M. J., Kida, S., & Zhang, E. T. (1997). [Immunologic significance of lymphatic drainage of the brain]. *Bull Acad Natl Med*, *181*(4), 661-667; discussion 667-671.
- Weller, R. O., Subash, M., Preston, S. D., Mazanti, I., & Carare, R. O. (2008). Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol*, *18*(2), 253-266. doi: 10.1111/j.1750-3639.2008.00133.x
- Xu, J., Chen, S., Ahmed, S. H., Chen, H., Ku, G., Goldberg, M. P., & Hsu, C. Y. (2001). Amyloid-beta peptides are cytotoxic to oligodendrocytes. *J Neurosci*, *21*(1), RC118.
- Xu, J., Chen, S., Ku, G., Ahmed, S. H., Xu, J., Chen, H., & Hsu, C. Y. (2001). Amyloid beta peptide-induced cerebral endothelial cell death involves mitochondrial dysfunction and caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab*, *21*(6), 702-710. doi: 10.1097/00004647-200106000-00008
- Yan, S. D., Chen, X., Fu, J., Chen, M., Zhu, H., Roher, A., . . . Schmidt, A. M. (1996). RAGE and amyloid-beta peptide neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, *382*(6593), 685-691. doi: 10.1038/382685a0
- Yan, X. Z., Qiao, J. T., Dou, Y., & Qiao, Z. D. (1999). Beta-amyloid peptide fragment 31-35 induces apoptosis in cultured cortical neurons. *Neuroscience*, *92*(1), 177-184.
- Yankner, B. A., Caceres, A., & Duffy, L. K. (1990). Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of beta amyloid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *87*(22), 9020-9023.
- Zhang, J., Ke, K. F., Liu, Z., Qiu, Y. H., & Peng, Y. P. (2013). Th17 cell-mediated neuroinflammation is involved in neurodegeneration of abeta1-42-induced Alzheimer's disease model rats. *PLoS One*, *8*(10), e75786. doi: 10.1371/journal.pone.0075786
- Zheng, H., & Koo, E. H. (2006). The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener*, *1*, 5. doi: 10.1186/1750-1326-1-5
- Zheng, H., & Koo, E. H. (2011). Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener*, *6*(1), 27. doi: 10.1186/1750-1326-6-27
- Zhu, X., Smith, M. A., Honda, K., Aliev, G., Moreira, P. I., Nunomura, A., . . . Perry, G. (2007). Vascular oxidative stress in Alzheimer disease. *J Neurol Sci*, *257*(1-2), 240-246. doi: 10.1016/j.jns.2007.01.039
- Zielasek, J., Tausch, M., Toyka, K. V., & Hartung, H. P. (1992). Production of nitrite by neonatal rat microglial cells/brain macrophages. *Cell Immunol*, *141*(1), 111-120.